

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 043081

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2023.04.25

(21) Номер заявки  
202090739

(22) Дата подачи заявки  
2018.10.12

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)

---

(54) БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ АНТИГЕН СОЗРЕВАНИЯ В-КЛЕТОК

---

(31) 62/572,375

(32) 2017.10.13

(33) US

(43) 2020.09.07

(86) PCT/US2018/055682

(87) WO 2019/075378 2019.04.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ХАРПУН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)

(72) Изобретатель:  
Веше Хольгер, Лемон Брайан Д.,  
Остин Ричард Дж. (US)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20130273055  
WO-A1-2013110531

---

(57) В изобретении раскрыты белки, связывающие антиген созревания В-клеток, с улучшенными аффинностями связывания и улучшенной способностью опосредовать уничтожение раковых клеток, экспрессирующих антиген созревания В-клеток (BCMA). Кроме того, предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие связывающие белки, раскрытые в настоящем документе, и способы лечения рака или его метастаза с использованием таких составов.

---

043081 B1

043081 B1

043081

B1

### Ссылка на родственную заявку

Согласно заявке на настоящий патент испрашивается преимущество в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/572375, поданной 13 октября 2017 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

### Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII, и настоящим полностью включен в качестве ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 11 октября 2018 г., называется 47517-722\_601\_SL.txt и характеризуется размером 232688 байт.

### Уровень техники изобретения

Рак является второй по значимости причиной смерти человека после ишемической болезни сердца. Во всем мире миллионы людей умирают от рака каждый год. Только в Соединенных Штатах от рака ежегодно умирает более полумиллиона человек, и ежегодно диагностируется около 1,4 миллиона новых случаев. Наряду с тем, что смертность от болезней сердца значительно снижается, число случаев смерти от рака, в целом, растет. В начале следующего столетия, по прогнозам, рак станет основной причиной смерти.

Более того, даже для тех онкологических пациентов, которые первоначально выживают после своих первичных раковых заболеваний, общий опыт показывает, что их жизнь резко изменяется. Многие онкологические пациенты испытывают сильные тревоги, вызванные осознанием возможности рецидива или неудачи лечения. Многие онкологические пациенты испытывают значительное физическое истощение после лечения.

Вообще говоря, фундаментальная проблема в лечении самых смертельных форм рака заключается в отсутствии эффективной и нетоксичной системной терапии. Рак является сложным заболеванием, характеризующимся генетическими мутациями, которые приводят к неконтролируемому росту клеток. Раковые клетки присутствуют во всех организмах, и в нормальных условиях их чрезмерный рост строго регулируется различными физиологическими факторами.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к однодоменным белкам, связывающим антиген созревания В-клеток (BCMA), которые можно использовать для диагностики и лечения показаний, коррелирующих с экспрессией BCMA.

В настоящем документе предусмотрен однодоменный белок, связывающий агент созревания В-клеток (BCMA), содержащий определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и CDR3, где (a) аминокислотная последовательность CDR1 является такой, как представлено в  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7PX_8G$  (SEQ ID NO: 1), где  $X_1$  представляет собой T или S;  $X_2$  представляет собой N, D или S;  $X_3$  представляет собой I, D, Q, H, V или E;  $X_4$  представляет собой F, S, E, A, T, M, V, I, D, Q, P, R или G;  $X_5$  представляет собой S, M, R или N;  $X_6$  представляет собой I, K, S, T, R, E, D, N, V, H, L, A, Q или G;  $X_7$  представляет собой S, T, Y, R или N; и  $X_8$  представляет собой M, G или Y; (b) аминокислотная последовательность CDR2 является такой, как представлено в  $AIX_9GX_{10}X_{11}TX_{12}YADSVK$  (SEQ ID NO: 2), где  $X_9$  представляет собой H, N или S;  $X_{10}$  представляет собой F, G, K, R, P, D, Q, H, E, N, T, S, A, I, L или V;  $X_{11}$  представляет собой S, Q, E, T, K или D; и  $X_{12}$  представляет собой L, V, I, F, Y или W; и (c) аминокислотная последовательность CDR3 является такой, как представлено в  $VPWGX_{13}YHPX_{14}X_{15}VX_{16}$  (SEQ ID NO: 3), где  $X_{11}$  представляет собой D, I, T, K, R, A, E, S или Y;  $X_{14}$  представляет собой R, G, L, K, T, Q, S или N;  $X_{15}$  представляет собой N, K, E, V, R, M или D; и  $X_{16}$  представляет собой Y, A, V, K, H, L, M, T, R, Q, C, S или N.

Согласно одному варианту осуществления CDR1 не содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 473. Согласно одному варианту осуществления CDR2 не содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 474. Согласно одному варианту осуществления CDR3 не содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 475. Согласно одному варианту осуществления CDR1 и CDR2 не содержат аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 473 и 474, соответственно. Согласно одному варианту осуществления CDR1 и CDR3 не содержат аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 473 и 475, соответственно. Согласно одному варианту осуществления CDR2 и CDR3 не содержат аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 474 и 475, соответственно. Согласно одному варианту осуществления CDR1, CDR2 и CDR3 не содержат аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 473, 474 и 475, соответственно.

В настоящем документе предусмотрен однодоменный связывающий BCMA белок, причем указанный белок содержит следующую формулу:  $f1-r1-f2-r2-r3-r3-f4$ , где  $r1$  представляет собой SEQ ID NO: 1;  $r2$  представляет собой SEQ ID NO: 2; и  $r3$  представляет собой SEQ ID NO: 3; и где  $f1$ ,  $f2$ ,  $f3$  и  $f4$  представляют собой каркасные остатки выбранные так, что указанный белок является на от около восьмидесят процентов (80%) до около 99% идентичным аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 346 или 472. В настоящем документе предусмотрен однодоменный связывающий BCMA белок, причем указанный белок содержит следующую формулу:  $f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4$ , где  $r1$  представляет собой SEQ ID NO: 1;  $r2$  представляет собой SEQ ID NO: 2; и  $r3$  представляет собой SEQ ID NO: 3; и где  $f1$ ,  $f2$ ,  $f3$  и  $f4$  представляют собой каркасные остатки, выбранные так, что указанный белок является на от

около 80% до около 90% идентичным аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 346 или 472. Согласно одному варианту осуществления аминокислотная последовательность однодоменного связывающего ВСМА белка не содержит SEQ ID NO: 472.

Согласно некоторым неограничивающим примерам r1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в виде любой из SEQ ID NO: 4-117.

Согласно некоторым неограничивающим примерам r2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в виде любой из SEQ ID NO: 118-231.

Согласно некоторым неограничивающим примерам r3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в виде любой из SEQ ID NO: 232-345.

Согласно другим неограничивающим примерам белок содержит аминокислотную последовательность, представленную в виде любой из SEQ ID NO: 346-460.

В однодоменном связывающем ВСМА белке f1 может содержать SEQ ID NO: 461 или 462.

В однодоменном связывающем ВСМА белке f2 может содержать SEQ ID NO: 463.

В однодоменном связывающем ВСМА белке f3 может содержать SEQ ID NO: 464 или 465.

В однодоменном связывающем ВСМА белке где f4 может содержать SEQ ID NO: 466 или 467.

Согласно одному неограничивающему примеру r1 содержит SEQ ID NO: 76, 114, 115, 116 или 117.

Согласно одному неограничивающему примеру r1 содержит SEQ ID NO: 76.

Согласно одному неограничивающему примеру r1 содержит SEQ ID NO: 76, r2 представляет собой SEQ ID NO: 190, и r3 представляет собой SEQ ID NO: 304.

Согласно одному неограничивающему примеру r1 содержит SEQ ID NO: 114, r2 содержит SEQ ID NO: 228, и r3 содержит SEQ ID NO: 342.

Согласно одному неограничивающему примеру r1 содержит SEQ ID NO: 115, r2 содержит SEQ ID NO: 229, и r3 содержит SEQ ID NO: 343.

Согласно одному неограничивающему примеру r1 содержит SEQ ID NO: 117, r2 содержит SEQ ID NO: 231, и r3 содержит SEQ ID NO: 345.

Согласно одному неограничивающему примеру r1 содержит SEQ ID NO: 116, r2 содержит SEQ ID NO: 230, и r3 содержит SEQ ID NO: 344.

Однодоменный связывающий ВСМА белок может характеризоваться периодом полувыведения, составляющим по меньшей мере 12 ч, по меньшей мере 20 ч, по меньшей мере 25 ч, по меньшей мере 30 ч, по меньшей мере 35 ч, по меньшей мере 40 ч, по меньшей мере 45 ч, по меньшей мере 50 ч, по меньшей мере 100 ч или больше. Согласно некоторым вариантам осуществления однодоменный связывающий ВСМА белок дополнительно содержит Fc-домен. Согласно некоторым вариантам осуществления однодоменный связывающий ВСМА белок дополнительно содержит противораковое средство.

В настоящем документе предусмотрен однодоменный связывающий ВСМА белок характеризуется исходной анти-ВСМА последовательностью 253BH10 SEQ ID NO: 472 ламы или гуманизированной версией этой последовательности ламы, BH2T, SEQ ID NO: 346, где один или более аминокислотных остатков, выбранных из положений аминокислот 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 и 34 в CDR1; положений 52, 54, 55 и 57 в CDR2; и положений 101, 105, 106 и 108 в CDR3, являются замещенными, где положение аминокислоты 26, если имеет место замена, то замена на S; положение аминокислоты 27, если имеет место замена, то замена на D или S; положение аминокислоты 28, если имеет место замена, то замена на D, Q, H, V, или E; положение аминокислоты 29, если имеет место замена, то замена на S, E, A, T, M, V, I, D, Q, P, R или G; положение аминокислоты 30, если имеет место замена, то замена на M, R или N; положение аминокислоты 31, если имеет место замена, то замена на K, S, T, R, E, D, N, V, H, L, A, Q или G; положение аминокислоты 32, если имеет место замена, то замена на T, Y, R или N; положение аминокислоты 34, если имеет место замена, то замена на G или Y; положение аминокислоты 52, если имеет место замена, то замена на N или S; положение аминокислоты 54, если имеет место замена, то замена на G, K, R, P, D, Q, H, E, N, T, S, A, I, L или V; положение аминокислоты 55, если имеет место замена, то замена на Q, E, T, K или D; положение аминокислоты 57, если имеет место замена, то замена на V, I, F, Y или W; положение аминокислоты 101, если имеет место замена, то замена на I, T, K, R, A, E, S или Y; положение аминокислоты 105, если имеет место замена, то замена на G, L, K, T, Q, S или N; положение аминокислоты 106, если имеет место замена, то замена на K, E, V, R, M или D; и положение аминокислоты 108, если имеет место замена, то замена на A, V, K, H, L, M, T, R, Q, C, S или N.

Такой однодоменный связывающий ВСМА белок может являться человеческим, гуманизированным, характеризоваться созревшей аффинностью или представлять собой их комбинацию.

В настоящем документе предусмотрен способ лечения или облегчения В-клеточного рака у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту однодоменного связывающего ВСМА белка, описанного в настоящем документе.

В настоящем документе предусмотрен мультиспецифический связывающий белок, содержащий однодоменный связывающий ВСМА белок, описанный в настоящем документе.

В настоящем документе предусмотрен способ лечения или облегчения В-клеточного рака у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту мультиспецифического связывающего белка, описанного в настоящем документе.

В-клеточный рак может представлять собой первичный рак или метастатический рак.

В-клеточный рак, подлежащий лечению с помощью способов, описанных в настоящем документе, может представлять собой множественную миелому, лейкоз, лимфому.

Включение посредством ссылки.

Все публикации, патенты и заявки на выдачу патентов, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация, патент или заявка на выдачу патента специально и индивидуально включена посредством ссылки.

### **Краткое описание графических материалов**

Новые признаки настоящего изобретения изложены с особым вниманием в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет достигнуто со ссылкой на следующее подробное раскрытие, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы настоящего изобретения, и следующие сопровождающие графические материалы:

На фиг. 1 проиллюстрирован эффект иллюстративных нацеленных на BCMA молекул (01H08, 01F07, 02F02 и BH253), содержащих связывающий BCMA белок согласно настоящему раскрытию, в уничтожении клеток EJM, которые экспрессируют BCMA, по сравнению с отрицательным контролем.

На фиг. 2 показано изображение SDS-PAGE репрезентативных очищенных нацеленных на BCMA триспецифических молекул. Дорожка 1: 01F07-M34Y TriTAC невосстановленный; дорожка 2: 01F07-M34G-TriTAC, невосстановленный; дорожка 3: 02B05 TriTAC, невосстановленный; дорожка 4: 02G02-M34Y TriTAC, невосстановленный; дорожка 5: 02G02 M34G TriTAC, невосстановленный; дорожка 6: стандарт SDS-PAGE широкого диапазона (Bio-Rad, № по кат. 1610317); дорожка 7: 01F07-M34Y TriTAC, невосстановленный; дорожка 8: 01F07-M34G-TriTAC, невосстановленный; дорожка 9: 02B05 TriTAC, невосстановленный; дорожка 10: 02G02-M34Y TriTAC, невосстановленный; дорожка 11: 02G02 M34G TriTAC, невосстановленный; и дорожка 12: стандарт SDS-PAGE широкого диапазона (Bio-Rad, № по кат. 1610317).

На фиг. 3A-3I проиллюстрирован эффект иллюстративных нацеленных на BCMA триспецифических молекул, содержащих связывающий BCMA белок согласно настоящему раскрытию, в уничтожении клеток Jeko1 (фиг. 3A-3C), MOLP-8 (фиг. 3D-3F) или OPM-2 (фиг. 3G-3I), которые экспрессируют BCMA, по сравнению с отрицательным контролем.

На фиг. 4A-4D проиллюстрировано связывание иллюстративного нацеленного на BCMA триспецифического белка, содержащего связывающий BCMA белок согласно настоящему раскрытию (02B05), с очищенными Т-клетками от 4 различных доноров-людей, донора 02 (фиг. 4A), донора 35 (фиг. 4B), донора 81 (фиг. 4C), донора 86 (фиг. 4D).

На фиг. 5A-5F проиллюстрировано связывание иллюстративного нацеленного на BCMA триспецифического белка (02B05) с клетками, экспрессирующими BCMA, NCI-H929 (фиг. 5A), EJM (фиг. 5B), OPM2 (фиг. 5D), RPMI8226 (фиг. 5E); или клеточными линиями, в которых отсутствует экспрессия BCMA, NCI-H510A (фиг. 5C) и DMS-153 (фиг. 5F).

На фиг. 6 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на BCMA триспецифического белка (02B05) и экспрессирующих BCMA клеток EJM, в присутствии или при отсутствии сывороточного альбумина человека (HSA).

На фиг. 7 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на BCMA триспецифического белка (02B05) и экспрессирующих BCMA клеток EJM, с использованием различных соотношений эффекторных клеток к целевым клеткам.

На фиг. 8 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на BCMA триспецифического белка (02B05) и экспрессирующих BCMA клеток OPM2, с использованием различных соотношений эффекторных клеток к целевым клеткам.

На фиг. 9 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на BCMA триспецифического белка (02B05) и экспрессирующих BCMA клеток NCI-H929, с использованием различных моментов времени и соотношения эффекторных клеток к целевым клеткам, составляющего 1:1.

На фиг. 10 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на BCMA триспецифического белка (02B05), экспрессирующих BCMA клеток EJM, и Т-клеток от четырех различных доноров, в присутствии сывороточного альбумина человека (HSA).

На фиг. 11 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на BCMA триспецифического белка (02B05), экспрессирующих BCMA клеток NCI-H929 и Т-клеток от четырех различных доноров, в присутствии сывороточного альбумина человека (HSA).

На фиг. 12 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на BCMA триспецифического белка (02B05), экспрессирующих BCMA клеток OPM2 и Т-клеток от четырех различных доноров, в присутствии сывороточного альбумина человека (HSA).

На фиг. 13 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на BCMA триспецифического белка (02B05), экспрессирующих BCMA клеток RPMI8226 и Т-

клеток от четырех различных доноров, в присутствии сывороточного альбумина человека (HSA).

На фиг. 14 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка (02B05), не экспрессирующих ВСМА клеток OVCAR8 и Т-клеток от четырех различных доноров, в присутствии сывороточного альбумина человека (HSA).

На фиг. 15 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка (02B05), не экспрессирующих ВСМА клеток NCI-H510A и Т-клеток от четырех различных доноров, в присутствии сывороточного альбумина человека (HSA).

На фиг. 16 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка (02B05), экспрессирующих ВСМА клеток NCI-H929 и мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от двух различных яванских макаков, в присутствии сывороточного альбумина человека (HSA).

На фиг. 17 проиллюстрированы результаты анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), экспрессирующих ВСМА клеток RPMI8226 и мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от двух различных яванских макаков доноров, в присутствии сывороточного альбумина человека (HSA).

На фиг. 18 проиллюстрирован уровень экспрессии биомаркера Т-клеточной активации CD69 после анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), и экспрессирующих ВСМА клеток EJM.

На фиг. 19 проиллюстрирован уровень экспрессии биомаркера Т-клеточной активации CD25 после анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05) и экспрессирующих ВСМА клеток EJM.

На фиг. 20 проиллюстрирован уровень экспрессии биомаркера Т-клеточной активации CD69 после анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), и экспрессирующих ВСМА клеток OPM2.

На фиг. 21 проиллюстрирован уровень экспрессии биомаркера Т-клеточной активации CD25 после анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), и экспрессирующих ВСМА клеток OPM2.

На фиг. 22 проиллюстрирован уровень экспрессии биомаркера Т-клеточной активации CD69 после анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), и экспрессирующих ВСМА клеток RPMI8226.

На фиг. 23 проиллюстрирован уровень экспрессии биомаркера Т-клеточной активации CD25 после анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), и экспрессирующих ВСМА клеток RPMI8226.

На фиг. 24 проиллюстрирован уровень экспрессии биомаркера Т-клеточной активации CD69 после анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), и не экспрессирующих ВСМА клеток OVCAR8.

На фиг. 25 проиллюстрирован уровень экспрессии биомаркера Т-клеточной активации CD25 после анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), и не экспрессирующих ВСМА клеток OVCAR8.

На фиг. 26 проиллюстрирован уровень экспрессии биомаркера Т-клеточной активации CD69 после анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), и не экспрессирующих ВСМА клеток NCI-H510A.

На фиг. 27 проиллюстрирован уровень экспрессии биомаркера Т-клеточной активации CD25 после анализа TDCC с использованием иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), и не экспрессирующих ВСМА клеток NCI-H510A.

На фиг. 28 проиллюстрирован уровень экспрессии цитокина, TNF- $\alpha$ , в совместных культурах Т-клеток и экспрессирующих ВСМА целевых клеток (клеток EJM), обработанных возрастающими концентрациями иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), или с помощью отрицательного контрольного нацеленного на GFP триспецифического белка.

На фиг. 29 проиллюстрировано снижение роста опухоли в ксенотрансплантатной модели

РРМ18226, получившей лечение с помощью иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02В05), в различных концентрациях, или с помощью контроля - носителя.

На фиг. 30 проиллюстрировано снижение роста опухоли в ксенотрансплантатной модели Jeko1, получившей лечение с помощью иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02В05), в различных концентрациях, или с помощью контроля - носителя.

На фиг. 31 проиллюстрирована концентрация нацеленного на ВСМА триспецифического белка в образцах сыворотки от яванских макаков, которым вводили различные концентрации иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02В05).

На фиг. 32 показаны результаты анализа ТДСС с использованием нацеленного на ВСМА триспецифического белка, полученного из образцов сыворотки яванских макаков, которым вводили различные концентрации иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02В05), экспрессирующих ВСМА клеток ЕЖМ и очищенных Т-клеток человека, в присутствии сыворотки яванских макаков, которым не вводили нацеленный на ВСМА триспецифический белок.

### **Подробное описание изобретения**

Несмотря на то, что в данном документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в настоящей области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Специалистам в настоящей области техники будут очевидны многочисленные вариации, изменения и замены без отступления от настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения, описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения и что таким образом будут охватываться способы и структуры в пределах объема этой формулы изобретения и ее эквивалентов.

Некоторые определения.

Используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных случаев и не предназначена для ограничения. Используемые в настоящем документе формы единственного числа предназначены также для включения форм множественного числа, если контекст явно не указывает на иное. Кроме того, в той мере, в которой термины "включающий в себя", "включает в себя", "характеризующийся", "характеризуется", "с" или их варианты используются в подробном раскрытии и/или формуле изобретения, такие термины предназначены для включительно способом, аналогичным термину "содержащий".

Термин "около" или "приблизительно" означает в пределах приемлемого диапазона ошибок для конкретного значения, определенного специалистом в настоящей области техники, который будет частично зависеть от того, как измерено или определено значение, например, от ограничений системы измерения. Например, "около" может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения для каждого данного значения. Если конкретные значения описаны в настоящей заявке и формуле изобретения, если не указано иное, следует предполагать, что термин "около" означает приемлемый диапазон ошибок для конкретного значения.

Термины "индивидуум", "пациент" или "субъект" используются взаимозаменяемо. Ни один из терминов не требует и не ограничивается ситуацией, характеризующейся наблюдением (например, постоянным или периодическим) работника здравоохранения (например, врача, дипломированной медсестры, практикующей медсестры, помощника врача, санитаря или работника хосписа).

"Антитело", как правило, относится к Y-образному тетрамерному белку, содержащему две тяжелые (H) и две легкие (L) полипептидные цепи, удерживаемые вместе ковалентными дисульфидными связями и нековалентными взаимодействиями. Легкие цепи человека содержат вариабельный домен (VL) и константный домен (CL), причем константный домен может быть легко классифицирован как каппа или лямбда на основании аминокислотной последовательности и генных локусов. Каждая тяжелая цепь содержит один вариабельный домен (VH) и константную область, которая в случае IgG, IgA и IgD содержит три домена, называемых CH1, CH2 и CH3 (IgM и IgE содержат четвертый домен, CH4). В классах IgG, IgA и IgD домены CH1 и CH2 разделены гибкой шарнирной областью, которая представляет собой богатый пролином и цистеином сегмент переменной длины (как правило, от около 10 до около 60 аминокислот в IgG). Вариабельные домены как в легкой, так и в тяжелой цепях соединены с константными доменами областью "J" из около 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь также содержит область "D" из около 10 дополнительных аминокислот. Каждый класс антител дополнительно содержит межцепочечные и внутрицепочечные дисульфидные связи, образованные парными остатками цистеина. Существует два типа нативных дисульфидных мостиков или связей в молекулах иммуноглобулина: межцепочечные и внутрицепочечные дисульфидные связи. Расположение и количество межцепочечных дисульфидных связей варьируются в зависимости от класса и вида иммуноглобулина. Межцепочечные дисульфидные

связи расположены на поверхности иммуноглобулина, доступны для растворителя и, как правило, относительно легко восстанавливаются. В изоците IgG1 человека присутствуют четыре межцепочечные дисульфидные связи, по одной от каждой тяжелой цепи к легкой цепи и две между тяжелыми цепями. Межцепочечные дисульфидные связи не являются необходимыми для ассоциации цепей. Хорошо известно, что шарнирная область тяжелой цепи IgG1, богатая цистеином, как правило, состоит из трех частей: верхней петли, центральной петли и нижней петли. Специалистам в настоящей области понятно, что шарнирная область IgG1 содержит цистеины в тяжелой цепи, которые содержат межцепочечные дисульфидные связи (две связи между тяжелыми цепями, две связи между тяжелой и легкой цепями), которые обеспечивают структурную гибкость, которая облегчает перемещения Fab. Межцепочечная дисульфидная связь между легкой и тяжелой цепью IgG1 образуется между C214 легкой каппа-цепи или лямбда-цепи и C220 в области верхней петли тяжелой цепи. Межцепочечные дисульфидные связи между тяжелыми цепями находятся в положениях C226 и C229 (все они пронумерованы в соответствии с индексом EU в соответствии с Kabat с соавт., ниже).

Используемый здесь термин "антитело" включает в себя поликлональные антитела, мультиклональные антитела, моноклональные антитела, химерные антитела, гуманизированные и приматизированные антитела, CDR-привитые антитела, человеческие антитела, рекомбинантно продуцируемые антитела, интраантитела, мультиспецифические антитела, биспецифические антитела, моновалентные антитела, мультивалентные антитела, антиидиотипические антитела, синтетические антитела, включая в себя мутации и их варианты, фрагменты иммуноспецифических антител, такие как фрагменты Fd, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab'), одноцепочечные фрагменты (например, ScFv и ScFvFc), связанные дисульфидной связью Fv (sdFv), фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1, линейные антитела, однодоменные антитела, такие как sdAb (домены VH, VL или VHH (такие как антитело только с тяжелой цепью, лишенное легкой цепи)); и их производные, включая в себя Fc-слияния и другие модификации, и любую другую иммунореактивную молекулу, если она содержит домен, содержащий сайт связывания для преимущественной ассоциации или связывания с белком ВСМА. Кроме того, если контекстное ограничение не диктует иное, термин дополнительно включает в себя все классы антител (т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM) и все подклассы (т.е. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2). Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, как правило, обозначаются соответствующими строчными буквами греческого алфавита: дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Легкие цепи антител из любых видов позвоночных могут быть отнесены к одному из двух четко различимых типов, называемых каппа (каппа) и лямбда (лямбда), на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов.

Термин "каркасные" или "FR" остатки (или области) относится к остаткам варибельного домена, отличным от остатков CDR или гиперварибельной области, как определено в настоящем документе. "Консенсусный каркасный остаток человека" представляет собой каркасный остаток, который представляет наиболее часто встречающийся аминокислотный остаток в ряде каркасных последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека.

Используемый в настоящем документе термин "варибельная область" или "варибельный домен" относится к тому факту, что определенные части варибельных доменов сильно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности каждого конкретного антитела для его конкретного антигена. Тем не менее, варибельность неравномерно распределена по варибельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых определяющими комплементарность областями (CDR) или гиперварибельными областями как в варибельных доменах легкой цепи, так и в варибельной области тяжелой цепи. Более высоко консервативные части варибельных доменов называются каркасными областями (FR). Каждый из варибельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре области FR, в значительной степени принимающих конфигурацию Р-листа, соединенных тремя CDR, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях образующие часть структуры Р-листа. CDR в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью областей FR и, вместе с CDR из другой цепи, способствуют образованию антиген-связывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной токсичности. "Нумерация остатков варибельного домена, как в Kabat" или "Нумерация аминокислотных положений, как в Kabat", и их варианты, относится к системе нумерации, используемой для варибельных доменов тяжелой цепи или варибельных доменов легкой цепи компиляции антител в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5 Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Используя эту систему нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или вставке в FR или CDR варибельного домена. Например, варибельный домен тяжелой цепи может включать в себя одну аминокислотную вставку (остаток 52a по Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. по Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков согласно Kabat может быть определена

для данного антитела путем выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" последовательностью, пронумерованной согласно Kabat. Не предполагается, что CDR согласно настоящему раскрытию обязательно соответствуют системе нумерации Kabat.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие ВСМА белки содержат антитело только с тяжелой цепью, такое как домен VH или VHH. В некоторых случаях связывающие ВСМА белки содержат антитело, содержащее только тяжелые цепи, которое представляет собой сконструированный человеческий домен VH. В некоторых примерах сконструированный человеческий домен VH получают путем пэннинга библиотек фагового дисплея. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие ВСМА белки содержат VHH. Используемый в настоящем документе термин "VHH" относится к одноцепочечному связывающему домену антитела, лишенному легкой цепи. В некоторых случаях VHH получают из антител того типа, который можно найти у Camelidae или хрящевых рыб, которые естественным образом лишены легких цепей, или к синтетическому и неиммунизированному VHH, который может быть сконструирован соответствующим образом. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область, кодируемую V-, D- и J-экзонами. В некоторых случаях VHH представляет собой природный VHH, такой как VHH, полученный от верблюдовых, или рекомбинантный белок, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления VHH получают из вида, выбранного из группы, состоящей из верблюдов, лам, викуний, гуанако и хрящевых рыб (таких как без ограничения акулы). Согласно другому варианту осуществления VHH получают из альпака (например, без ограничения альпака Huacaya или альпака Suri).

Используемый в настоящем документе термин "процентная (%) идентичность аминокислотной последовательности" по отношению к последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пропусков, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности, и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалисту в настоящей области техники, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программное обеспечение EMBOSS MATCHER, EMBOSS WATER, EMBOSS STRETCHER, EMBOSS NEEDLE, EMBOSS LALIGN, BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в настоящей области техники могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая в себя любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Используемый в настоящем документе термин "период полувыведения" используется в его обычном смысле, как описано в Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics 21-25 (Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman, and Alfred Gilman, eds., 6<sup>th</sup> ed. 1980). Вкратце, этот термин предназначен для охвата количественного измерения времени выведения лекарственного средства. Выведение большинства лекарственных средств является экспоненциальным (т.е. соответствует кинетике первого порядка), поскольку концентрации лекарственных средств, как правило, не приближаются к тем, которые требуются для насыщения процесса выведения. Скорость экспоненциального процесса может быть выражена его константой скорости  $k$ , которая выражает фракционное изменение за единицу времени, или его полупериодом  $t_{1/2}$  -временем, необходимым для завершения процесса на 50%. Единицами этих двух констант являются время<sup>-1</sup> и время соответственно. Константа скорости первого порядка и период полураспада реакции связаны простой корреляцией ( $k \times t_{1/2} = 0,693$ ) и могут соответственно являться взаимозаменяемыми. Поскольку кинетика выведения первого порядка обуславливает то, что постоянная доля лекарственного средства теряется в единицу времени, график зависимости концентрации лекарственного средства от времени является линейным во все времена после начальной фазы распределения (т.е. после того, как поглощение и распределение лекарственного средства завершено). Полупериод для выведения лекарственных средств можно точно определить по такому графику.

Используемый в настоящем документе термин "аффинность связывания" относится к аффинности белков, описанных в настоящем раскрытии, к их мишеням связывания и выражается численно с использованием значений " $K_d$ ". Если указано, что два или больше белков характеризуются сравнимыми аффинностями связывания с их мишенями связывания, то значения  $K_d$  для связывания соответствующих белков с их мишенями связывания находятся в пределах  $\pm 2$ -кратного значения друг от друга. Если указано, что два или больше белков характеризуются сравнимыми аффинностями связывания с одной мишенью связывания, то значения  $K_d$  для связывания соответствующих белков с указанной одной мишенью связывания находятся в пределах  $\pm 2$ -кратного значения друг от друга. Если указано, что белок связывает две или более мишеней с сопоставимой аффинностью связывания, то значения  $K_d$  для связывания указанного белка с двумя или более мишенями находятся в пределах  $\pm 2$ -кратного значения друг от друга. В целом, более высокое значение  $K_d$  соответствует более слабому связыванию. Согласно некоторым вариантам осуществления " $K_d$ " измеряют с помощью анализа связывания меченного радиоактивным изотопом антигена (RIA) или анализа поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIACORE®-2000



или BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.). Согласно определенным вариантам осуществления также определяют "скорость ассоциации" или "kon" и "скорость диссоциации" или "koff" с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса с использованием BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Согласно дополнительным вариантам осуществления " $K_d$ ", "kon" и "koff" измеряют с использованием систем OCTET® (Pall Life Sciences). В иллюстративном способе измерения аффинности связывания с использованием систем OCTET® лиганд, например, биотинилированный ВСМА человека, иммобилизован на поверхности стрептавидинового наконечника капиллярного датчика OCTET®, затем стрептавидиновые наконечники активируют в соответствии с инструкциями производителя с использованием примерно 20-50 мкг/мл белка ВСМА человека. Раствор PBS/казеин также вводят в качестве блокирующего агента. Для кинетических измерений ассоциации варианты связывающего ВСМА белка вводят в концентрации от около 10 нг/мл до около 100 мкг/мл, от около 50 нг/мл до около 5 мкг/мл или от около 2 нг/мл до около 20 мкг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления однодоменные связывающие ВСМА белки используют в концентрации в диапазоне от около 2 нг/мл до около 20 мкг/мл. Полная диссоциация наблюдается в случае отрицательного контроля, буфера для анализа без связывающих белков. Кинетические параметры реакций связывания затем определяют с использованием соответствующего инструмента, например программного обеспечения ForteBio.

В настоящем документе описаны связывающие ВСМА белки, фармацевтические композиции, а также нуклеиновые кислоты, рекомбинантные экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения таких связывающих ВСМА белков. Кроме того, предусмотрены способы использования раскрытых связывающих ВСМА белков для профилактики и/или лечения заболеваний, состояний и нарушений. Связывающие ВСМА белки способны специфически связываться с ВСМА. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие ВСМА белки включают в себя дополнительные домены, такие как CD3-связывающий домен и альбуминсвязывающий домен.

Антиген созревания В-клеток (ВСМА).

Антиген созревания В-клеток (ВСМА, TNFRSF17, CD269) представляет собой трансмембранный белок, принадлежащий суперсемейству рецепторов семейства некроза опухолей (TNFR), который преимущественно экспрессируется в окончательно дифференцированных В-клетках. Экспрессия ВСМА ограничена линией дифференцировки В-клеток и в основном присутствует в плазматических клетках и плазмобластах и в некоторой степени в В-клетках памяти, но практически отсутствует в периферических и наивных В-клетках. ВСМА также экспрессируется на клетках множественной миеломы (ММ), на клетках лейкоза и клетках лимфомы.

ВСМА была идентифицирована путем молекулярного анализа транслокации t(4;16)(q26;p13), обнаруженной в Т-клеточной лимфоме кишечника человека, и последовательность внутри рамки считывания была отнесена к сегменту хромосомы 16p13.1.

кДНК ВСМА человека содержит открытую рамку считывания длиной в 552 п.н., которая кодирует полипептид из 184 аминокислот. Ген ВСМА организован в три экзона, которые разделены двумя интронами, каждый из которых фланкирован консенсусными сайтами сплайсинга донора GT и акцептора AG и кодирует транскрипт в 1,2 т.п.н. Структура белка ВСМА включает в себя интегральный трансмембранный белок, основанный на центральной 24-аминокислотной гидрофобной области в структуре альфа-спирали.

Ген ВСМА мыши расположен в хромосоме 16, синтеничной области 16p13 человека, и также включает в себя три экзона, которые разделены двумя интронами. Ген кодирует белок из 185 аминокислот. мРНК мышинного ВСМА экспрессируется в виде транскрипта длиной 404 п.н. на самых высоких уровнях в клетках плазмцитомы (J558) и на умеренных уровнях в линии В-клеточной лимфомы A20. Транскрипты мРНК мышинного ВСМА также были обнаружены на низких уровнях в линиях Т-клеточной лимфомы (EL4, BW5147) и линиях дендритных клеток (CB1D6, D2SC1) в отличие от линий клеток человека Т-клеточного и дендритного происхождения. Последовательность кДНК ВСМА мыши характеризуется 69,3% нуклеотидной идентичностью по отношению к последовательности кДНК ВСМА человека и немного более высокой идентичностью (73,7%) при сравнении кодирующих областей между этими двумя последовательностями кДНК. Белок ВСМА мыши на 62% идентичен белку ВСМА человека и, как и ВСМА человека, содержит одну гидрофобную область, которая может представлять собой внутренний трансмембранный сегмент. N-концевой 40-аминокислотный домен как белка ВСМА мыши, так и белка ВСМА человека содержит шесть консервативных остатков цистеина, что согласуется с образованием мотива цистеинового повтора, обнаруженного во внеклеточном домене TNFR. Подобно представителям суперсемейства TNFR, белок ВСМА содержит консервативный ароматический остаток, расположенный на расстоянии от четырех до шести остатков по направлению к С-концу от первого цистеина.

ВСМА не экспрессируется на клеточной поверхности, а находится на аппарате Гольджи. Степень экспрессии ВСМА пропорциональна стадии клеточной дифференцировки (самая высокая - в плазматических клетках).

ВСМА участвует в развитии и гомеостазе В-клеток благодаря своему взаимодействию с его лигандами BAFF (фактор активации В-клеток, также обозначаемый как TALL-1 или TNFSF13B) и APRIL (ли-

ганд, индуцирующий пролиферацию).

BCMA регулирует различные аспекты гуморального иммунитета, развития и гомеостаза В-клеток вместе с представителями его семейства TACI (трансмембранный активатор и партнер лиганда циклофилина) и BAFF-R (рецептор фактора активации В-клеток, также известный как представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 13C). Экспрессия BCMA проявляется довольно поздно при дифференцировке В-клеток и способствует долгосрочному выживанию плазмобластов и плазматических клеток в костном мозге. BCMA также поддерживает рост и выживание клеток множественной миеломы (ММ).

BCMA в основном известен своей функциональной активностью в обеспечении выживания плазматических клеток, которые поддерживают длительный гуморальный иммунитет.

Существует потребность в вариантах лечения для солидных опухолевых заболеваний, связанных с избыточной экспрессией BCMA, таких как множественная миелома, лейкозы и лимфомы. Согласно настоящему раскрытию согласно определенным вариантам осуществления предусмотрены однодоменные белки, которые специфически связываются с BCMA на поверхности опухолевых клеток-мишеней.

Связывающие BCMA белки.

В настоящем документе предусмотрены связывающие BCMA белки. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрены связывающие белки, такие как однодоменные антитела к BCMA или варианты антител, которые связываются с эпитопом в белке BCMA. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок связывается с белком BCMA человека, содержащим последовательность согласно SEQ ID NO: 468. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок связывается с белком BCMA человека, содержащим усеченную последовательность по сравнению с SEQ ID NO: 468.

Согласно одному неограничивающему примеру связывающий BCMA белок связывается с белком BCMA человека, содержащим аминокислотные остатки 5-51 согласно SEQ ID NO: 468.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие BCMA белки согласно настоящему раскрытию могут быть экспрессированы в мультидоменном белке, который включает в себя дополнительные домены иммуноглобулина. Такие мультидоменные белки могут действовать посредством ингибирования роста опухоли на основе иммунотоксичности и индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления мультидоменные белки, содержащие связывающие BCMA белки согласно настоящему раскрытию, проявляют комплементзависимую цитотоксическую (CDC) активность. Согласно некоторым вариантам осуществления мультидоменные белки, содержащие связывающие BCMA белки согласно настоящему раскрытию, проявляют активность ADCC и CDC против раковых клеток, экспрессирующих BCMA. Аминокислотную последовательность Fc-домена можно добавить к связывающим BCMA белкам, описанным настоящим документе, для индукции ACDD или CDC. Аминокислотные последовательности Fc-доменов известны в настоящей области техники и предусмотрены в настоящем документе.

Связывающий BCMA белок, описанный в настоящем документе, связывается с внеклеточным доменом BCMA. В одном случае связывающий BCMA белок, описанный в настоящем документе, связывается с аминокислотными остатками 5-51 BCMA человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок представляет собой антитело к BCMA или вариант антитела. Используемый в настоящем документе термин "вариант антитела" относится к вариантам и производным антитела, описанного в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления предусмотрены варианты аминокислотной последовательности антител к BCMA, описанных в настоящем документе. Например, согласно определенным вариантам осуществления варианты аминокислотной последовательности антител к BCMA, описанных в настоящем документе, предусмотрены для улучшения аффинности связывания и/или других биологических свойств антител. Иллюстративные способы получения аминокислотных вариантов включают в себя без ограничения введение соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают в себя, например, делеции, и/или вставки, и/или замены остатков в пределах аминокислотных последовательностей антитела.

Любая комбинация делеции, вставки и замены может быть достигнута для достижения конечного конструкта, при условии, что конечный конструкт обладает требуемыми характеристиками, например, связыванием антигена. Согласно определенным вариантам осуществления предусмотрены варианты антител, характеризующиеся одной или более аминокислотными заменами. Представляющие интерес сайты для заместительного мутагенеза, включают в себя CDR и каркасные области. Примеры таких замен описаны ниже. Аминокислотные замены можно вводить в представляющее интерес антитело и продукты, подвергнутые скринингу в отношении требуемой активности, например, сохраненное/улучшенное связывание антигена, пониженная иммуногенность или улучшенная антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Для получения вариантов антител предусмотрены как консервативные, так и неконсервативные аминокислотные замены.

В другом примере замены для создания вариантного антитела к BCMA замещен один или более остатков гипервариабельной области исходного антитела. В общем, варианты затем выбирают на основа-

нии улучшений требуемых свойств по сравнению с исходным антителом, например, повышенная аффинность, пониженная аффинность, пониженная иммуногенность, повышенная зависимость связывания от pH. Например, вариантное антитело с созревшей аффинностью можно получить, например, с использованием техник созревания аффинности на основе фагового дисплея, таких как описанные в настоящем документе и известные в настоящей области техники.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок, описанный в настоящем документе, представляет собой однодоменное антитело, такое как вариабельный домен тяжелой цепи (VH), вариабельный домен (VHH) происходящего от ламы sdAb, пептид, лиганд или малая молекула, специфические в отношении для ВСМ. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА домен описанного в настоящем документе связывающего ВСМА белка представляет собой любой домен, который связывается с ВСМА, включая в себя без ограничения домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела. Согласно определенным вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело. Согласно другим вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой пептид. Согласно дополнительным вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой малую молекулу.

Как правило, следует отметить, что термин "однодоменное антитело", используемый в настоящем документе, в его самом широком смысле не ограничен конкретным биологическим источником или конкретным способом получения. Однодоменные антитела представляют собой антитела, чьи определяющие комплементарность области являются частью однодоменного полипептида. Примеры включают в себя без ограничения антитела только с тяжелыми цепями, антитела, естественно лишенные легких цепей, однодоменные антитела, полученные из обычных 4-цепочечных антител, сконструированные антитела и однодоменные каркасы, отличные от каркасов, полученных из антител. Однодоменные антитела могут представлять собой любые из предшествующего уровня техники или любые будущие однодоменные антитела. Однодоменные антитела можно получить из любых видов, включая в себя без ограничения мышь, человека, верблюда, ламу, козу, кролика и быка. Например, согласно некоторым вариантам осуществления однодоменные антитела согласно настоящему раскрытию получают:

- (1) путем выделения домена VHH встречающегося в природе антитела только с тяжелыми цепями;
- (2) путем экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей встречающийся в природе домен VHH;
- (3) путем "гуманизации" встречающегося в природе домена VHH или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой гуманизированный домен VHH;
- (4) путем "камелизации" встречающегося в природе домена VH из любых видов животных и, в частности, из вида млекопитающего, такого как человек, или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой камелизованный домен VH;
- (5) путем "камелизации" "доменного антитела" или "Dab" или путем экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей такой камелизованный домен VH;
- (6) с использованием синтетических или полусинтетических техник получения белков, полипептидов или других аминокислотных последовательностей;
- (7) путем получения нуклеиновой кислоты, кодирующей однодоменное антитело, с использованием техник синтеза нуклеиновых кислот, известных в настоящей области техники, с последующей экспрессией полученной таким образом нуклеиновой кислоты; и/или
- (8) с помощью любой комбинации одного или более из вышеперечисленных.

Согласно одному варианту осуществления однодоменное антитело соответствует доменам VHH встречающихся в природе антител только с тяжелыми цепями, направленных против ВСМА. Как дополнительно описано в настоящем документе, такие последовательности VHH можно, как правило, создать или получить путем соответствующей иммунизации вида ламы с помощью ВСМА (т.е. чтобы вызвать иммунный ответ и/или получить антитела только с тяжелыми цепями, направленные против ВСМА), путем получения подходящего биологического образца из указанной ламы (такого как образец крови, образец сыворотки или образец В-клеток) и путем создания последовательностей VHH, направленных против ВСМА, начиная с указанного образца, с использованием любой подходящей техники, известной в настоящей области техники.

Согласно другому варианту осуществления такие встречающиеся в природе домены VHH против ВСМА получают из наивных библиотек последовательностей VHH верблюдовых, например, путем скрининга такой библиотеки с использованием ВСМА или по меньшей мере одной ее части, фрагмента, антигенной детерминанты или эпитопа с использованием одной или более техник скрининга, известных в настоящей области техники. Такие библиотеки и техники описаны, например, в международных патентных публикациях WO 99/37681, WO 01/90190, WO 03/025020 и WO 03/035694. Альтернативно, используют улучшенные синтетические или полусинтетические библиотеки, полученные из наивных библиотек VHH, такие как библиотеки VHH, полученные из наивных библиотек VHH такими методами, как случайный мутагенез и/или "перетасовка" CDR, как, например, описано в международной патентной публикации WO 00/43507.

Согласно дополнительному варианту осуществления еще одна техника получения последовательностей VHH, направленных против ВСМА, предусматривает подходящую иммунизацию трансгенного млекопитающего, которое способно экспрессировать антитело только с тяжелыми цепями (т.е. чтобы вызвать иммунный ответ и/или антитела только с тяжелыми цепями, направленные против ВСМА), получение подходящего биологического образца от указанного трансгенного млекопитающего (такого как образец крови, образец сыворотки или образец В-клеток) и затем создание последовательностей VHH, направленных против ВСМА, начиная с указанного образца, с использованием любой подходящей техники, известной в настоящей области техники. Например, для этой цели можно использовать крыс или мышей, экспрессирующих антитела только с тяжелыми цепями, и дополнительные способы и техники, описанные в международных патентных публикациях WO 02/085945 и в WO 04/049794.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к ВСМА, как описано в настоящем документе, содержит однодоменное антитело с аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности встречающегося в природе домена VHH, но которая была "гуманизирована", т.е. путем замены одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности указанной встречающейся в природе последовательности VHH (и, в частности, в каркасных последовательностях) одним или более аминокислотными остатками, которые встречаются в соответствующем(их) положении(ях) в домене VH из обычного 4-цепочечного антитела из организма человека (например, как указано выше). Это можно выполнить способом, известным в настоящей области техники, который будет понятен специалисту в настоящей области техники, например, на основании дополнительного описания в настоящем документе. Опять же, следует отметить, что такие гуманизированные однодоменные антитела к ВСМА согласно настоящему раскрытию получают любым подходящим способом, известным *per se* (т.е. как указано в пунктах (1)-(8) выше) и, таким образом, они строго не ограничены полипептидами, которые были получены с использованием полипептида, который содержит встречающийся в природе домен VHH, в качестве исходного материала. Согласно некоторым дополнительным вариантам осуществления однодоменное антитело к ВСМА, как описано в настоящем документе, содержит однодоменное антитело с аминокислотной последовательностью, которая соответствует аминокислотной последовательности встречающегося в природе домена VH, но которая была "камелизована", т.е. путем замены одного или более аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности встречающегося в природе домена VH из обычного 4-цепочечного антитела одним или более аминокислотными остатками, которые встречаются в соответствующем(их) положении(ях) в домене VHH антитела только с тяжелыми цепями. Такие "камелизирующие" замены предпочтительно введены в положения аминокислот, которые образуют и/или присутствуют на границе VH-VL, и/или на так называемых характерных для Camelidae остатках (см., например, международную патентную публикацию WO 94/04678 и Davies and Riechmann (1994 и 1996)). Предпочтительно последовательность VH, которую используют в качестве исходного материала или отправной точки для создания или конструирования камелизованного одиночного домена, предпочтительно представляет собой последовательность VH от млекопитающего, более предпочтительно последовательность VH человека, такую как последовательность VH3. Тем не менее, следует отметить, что такие камелизованные однодоменные антитела к ВСМА согласно настоящему раскрытию согласно определенным вариантам осуществления получают любым подходящим способом, известным в настоящей области техники (т.е. как указано в пунктах (1)-(8) выше), и таким образом, они строго не ограничиваются полипептидами, которые были получены с использованием полипептида, который содержит встречающийся в природе домен VH, в качестве исходного материала. Например, как дополнительно описано в настоящем документе, как "гуманизацию", так и "камелизацию" выполняют путем получения нуклеотидной последовательности, которая кодирует встречающийся в природе домен VHH или домен VH, соответственно, и затем путем изменения одного или более кодонов в указанной нуклеотидной последовательности таким образом, что новая нуклеотидная последовательность кодирует "гуманизированное" или "камелизованное" однодоменное антитело, соответственно. Затем эту нуклеиновую кислоту можно экспрессировать с тем, чтобы получить требуемое однодоменное антитело к ВСМА согласно настоящему раскрытию. Альтернативно, согласно другим вариантам осуществления на основе аминокислотной последовательности встречающегося в природе домена VHH или домена VH, соответственно, конструируют аминокислотную последовательность требуемого гуманизированного или камелизованного однодоменного антитела к ВСМА согласно настоящему раскрытию, соответственно, и затем синтезируют *de novo* с использованием известных техник синтеза пептидов. Согласно некоторым вариантам осуществления на основе аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности встречающегося в природе домена VHH или домена VH, соответственно, конструируют нуклеотидную последовательность, кодирующую требуемое однодоменное гуманизированное или камелизованное антитело к ВСМА согласно настоящему раскрытию, соответственно, и затем синтезируют *de novo* с использованием известных техник синтеза нуклеиновой кислоты, после чего полученную таким образом нуклеиновую кислоту экспрессируют с использованием известных техник экспрессии с тем, чтобы получить требуемое однодоменное антитело к ВСМА согласно настоящему раскрытию.

Другие подходящие способы и техники получения однодоменного антитела к ВСМА согласно на-

стоящему раскрытию и/или нуклеиновых кислот, кодирующих их, начиная с встречающихся в природе последовательностей VH или последовательностей VHH, например, предусматривают объединение одной или более частей одной или более встречающихся в природе последовательностей VH (таких как одна или более каркасных (FR) последовательностей и/или последовательностей определяющей комплементарности области (CDR)), одной или более частей одной или более встречающихся в природе последовательностей VHH (таких как одна или более последовательностей FR или последовательностей CDR), и/или одной или более синтетических или полусинтетических последовательностей, подходящим образом, с тем, чтобы получить однодоменное антитело к ВСМА согласно настоящему раскрытию или нуклеотидную последовательность или нуклеиновую кислоту, кодирующую его.

Предполагается, что согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок является довольно маленьким и составляет не более 25 кДа, не более 20 кДа, не более 15 кДа или не более 10 кДа согласно некоторым вариантам осуществления. В определенных случаях связывающий ВСМА белок составляет 5 кДа или меньше, если он представляет собой пептид или малую молекулу.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой специфическое антитело к ВСМА, содержащее определяющую комплементарность область вариабельной области тяжелой цепи CDR1, CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, CDR1 вариабельной области легкой цепи, CDR2 вариабельной области легкой цепи и CDR3 вариабельной области легкой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок содержит любой домен, который связывается с ВСМА, включая в себя без ограничения домены из моноклонального антитела, поликлонального антитела, рекомбинантного антитела, антитела человека, гуманизированного антитела или антигенсвязывающих фрагментов, таких как однодоменные антитела (sdAb), фрагменты Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub> и Fv, фрагменты, состоящие из одной или более CDR, одноцепочечные антитела (например, одноцепочечные фрагменты Fv (scFv)), стабилизированные дисульфидными связями (dsFv) фрагменты Fv, гетероконъюгатные антитела (например, биспецифические антитела), фрагменты pFv, мономеры или димеры тяжелых цепей, мономеры или димеры легких цепей и димеры, состоящий из одной тяжелой цепи и одной легкой цепи. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело. Согласно некоторым вариантам осуществления однодоменное антитело к ВСМА содержит определяющие комплементарность области вариабельной области тяжелой цепи (CDR), CDR1, CDR2 и CDR3.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая состоит из четырех каркасных областей/последовательностей (f1-f4), прерываемых тремя определяющими комплементарность областями/последовательностями, как представлено формулой: f1-r1-f2-r2-f3-r3-f4, где r1, r2 и r3 представляют собой определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и f1, f2, f3 и f4 представляют собой каркасные остатки. Остатки r1 связывающего ВСМА белка согласно настоящему раскрытию содержат, например, аминокислотные остатки 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 34; остатки r2 связывающего ВСМА белка согласно настоящему раскрытию содержат, например, аминокислотные остатки, например, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62 и 63; и остатки r3 связывающего ВСМА белка согласно настоящему раскрытию содержат, например, аминокислотные остатки, например, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 и 108. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 346-460.

Согласно одному варианту осуществления CDR1 не содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 473. Согласно одному варианту осуществления CDR2 не содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 474. Согласно одному варианту осуществления CDR3 не содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 475.

Согласно некоторым вариантам осуществления CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 1, или ее вариант, характеризующийся 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотными заменами. Иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 4. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 5. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 6. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 7. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 8. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 9. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 10. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 11. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 12. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 13. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 14. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 15. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 15. Другая иллюстративная CDR1 содержит аминокислотную последовательность, как представлено в SEQ ID NO: 15.



- 14 -





- 16 -

- 17 -

[illegible]



Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 360. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 361. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 362. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 363. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 364. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 365. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 366. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 367. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 368. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий BCMA белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 369.

- 20 -





ния связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 446. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 447. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 448. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 449. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 450.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 451. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 452. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 453. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 454. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 455. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 456. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 457. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 458. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 459. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок представляет собой однодоменное антитело, содержащее последовательность согласно SEQ ID NO: 460.

Связывающий ВСМА белок, описанный в настоящем документе, может связываться с ВСМА человека с  $K_d$  в диапазоне от около 0,1 нМ до около 500 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,1 нМ до около 450 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,1 нМ до около 400 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,1 нМ до около 350 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,1 нМ до около 300 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,1 нМ до около 250 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,1 нМ до около 200 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,1 нМ до около 150 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,1 нМ до около 100 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,1 нМ до около 90 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,2 нМ до около 80 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,3 нМ до около 70 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,4 нМ до около 50 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,5 нМ до около 30 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,6 нМ до около 10 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,7 нМ до около 8 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,8 нМ до около 6 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 0,9 нМ до около 4 нМ. Согласно некоторым вариантам осуществления  $hK_d$  находится в диапазоне от около 1 нМ до около 2 нМ.

Согласно некоторым вариантам осуществления любой из вышеуказанных связывающих ВСМА белков представляет собой аффинный пептид, меченный для простоты очистки. Согласно некоторым вариантам осуществления метка аффинного пептида представляет собой шесть последовательных остатков гистидина, также называемых His-меткой или 6×His-меткой (например, SEQ ID NO: 471).

Согласно определенным вариантам осуществления связывающие ВСМА белки в соответствии с настоящим раскрытием могут быть включены в триспецифические белки, нацеленные на ВСМА. В некоторых примерах триспецифический связывающий белок содержит домен, связывающий CD3, домен, связывающий человеческий сывороточный альбумин (HSA) и анти-ВСМА связывающий домен в соответствии с настоящим раскрытием. В некоторых случаях триспецифический связывающий белок содержит домены, описанные выше, в следующей ориентации: ВСМА-HSA-CD3.

Согласно определенным вариантам осуществления связывающие ВСМА белки согласно настоящему раскрытию предпочтительно связывают мембраносвязанный ВСМА по сравнению с растворимым ВСМА. Мембраносвязанный ВСМА относится к наличию ВСМА внутри или на поверхности клеточной мембраны клетки, которая экспрессирует ВСМА. Растворимый ВСМА относится к ВСМА, который



больше не находится внутри или на поверхности клеточной мембраны клетки, которая экспрессирует или экспрессировала ВСМА. В определенных случаях растворимый ВСМА присутствует в крови и/или лимфатической системе у субъекта. Согласно одному варианту осуществления связывающие ВСМА белки связывают мембраносвязанный ВСМА по меньшей мере в 5 раз, в 10 раз, в 15 раз, в 20 раз, в 25 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 100 раз, в 500 раз или в 1000 раз больше, чем растворимый ВСМА. Согласно одному варианту осуществления антигенсвязывающие белки согласно настоящему раскрытию предпочтительно связывают мембраносвязанный ВСМА в 30 раз больше, чем растворимый ВСМА. Определение преимущественного связывания антигенсвязывающего белка с мембраносвязанным ВСМА по сравнению с растворимым ВСМА можно легко определить с использованием анализов, хорошо известных в настоящей области техники.

Интеграция в химерные рецепторы антигена (CAR).

Связывающие ВСМА белки согласно настоящему раскрытию, например, однодоменное антитело к ВСМА, согласно определенным примерам могут быть включены в химерный рецептор антигена (CAR). Сконструированную иммунную эффекторную клетку, например, Т-клетку или НК-клетку, можно использовать для экспрессии CAR, который включает в себя однодоменное антитело к ВСМА, как описано в настоящем документе. Согласно одному из вариантов осуществления CAR, включающий в себя однодоменное антитело к ВСМА, как описано в настоящем документе, соединен с трансмембранным доменом через шарнирную область и, кроме того, с костимулирующим доменом, например функциональным сигнальным доменом, полученным из OX40, CD27, CD28, CD5, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278) или 4-1BB. Согласно некоторым вариантам осуществления CAR дополнительно содержит последовательность, кодирующую внутриклеточный сигнальный домен, такой как 4-1BB и/или дзета CD3.

Мультиспецифический белок, нацеленный на ВСМА.

Один вариант осуществления относится к мультиспецифическому белку, содержащему связывающий ВСМА домен, причем связывающий ВСМА домен соответствует любому из приведенных выше вариантов осуществления. Согласно некоторым вариантам осуществления мультиспецифический белок содержит связывающий ВСМА домен согласно любому из приведенных выше вариантов осуществления (анти-ВСМА домен), связывающий CD3 домен (анти-CD3 домен) и альбуминсвязывающий домен (анти-ALB домен). Согласно некоторым вариантам осуществления нацеленный на ВСМА мультиспецифический белок представляет собой триспецифический белок, причем триспецифический белок характеризуется таким порядком доменов:  $H_2N-(C)-(A)-(B)-COOH$ . Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ВСМА домен (домен против мишени, Т), анти-CD3 домен (С) и анти-ALB домен (А) расположены в ориентации (САТ): анти-CD3: анти-ALB: анти-ВСМА. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-ВСМА домен (домен против мишени, Т), анти-CD3 домен (С) и анти-ALB домен (А) расположены в ориентации (ТАС): анти-ВСМА: анти-ALB: анти-CD3 (ТАС).

Свойства снижения роста опухоли.

Согласно определенным вариантам осуществления связывающие ВСМА белки согласно настоящему раскрытию снижают количество опухолевых клеток *in vivo* при введении субъекту, у которого есть опухолевые клетки, которые экспрессируют ВСМА. Измерение снижения роста опухолевых клеток можно определить множеством различных методологий, хорошо известных в настоящей области техники. Неограничивающие примеры включают в себя прямое измерение размера опухоли, измерение массы иссеченной опухоли и сравнение с контрольными субъектами, измерение с помощью техник визуализации (например, КТ или МРТ), в которых могут использовать или не использовать изотопы или люминесцентные молекулы (например, люциферазу) для усиления анализа и тому подобное. Согласно конкретным вариантам осуществления введение антигенсвязывающих агентов согласно настоящему раскрытию приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим агентом по меньшей мере около на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, при этом около 100% снижение роста опухоли указывает на полный ответ и исчезновение опухоли. Согласно дополнительным вариантам осуществления введение антигенсвязывающих агентов согласно настоящему раскрытию приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим агентом на около 50-100%, на около 75-100% или на около 90-100%. Согласно дополнительным вариантам осуществления введение антигенсвязывающих агентов согласно настоящему раскрытию приводит к снижению роста опухолевых клеток *in vivo* по сравнению с контрольным антигенсвязывающим агентом на около 50-60%, на около 60-70%, на около 70-80%, на около 80-90% или на около 90-100%.

Модификации связывающих ВСМА белков.

Связывающие ВСМА белки, описанные в настоящем документе, охватывают производные или аналоги, в которых

- (i) аминокислота замещена аминокислотным остатком, который не кодируется генетическим кодом,
- (ii) зрелый полипептид слит с другим соединением, таким как полиэтиленгликоль, или
- (iii) дополнительные аминокислоты слиты с белком, такие как лидерная или секреторная последовательность или последовательность для блокирования иммуногенного домена и/или для очистки белка.

Типичные модификации включают в себя без ограничения следующее: ацетилирование, ацилирование, ADP-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присое-

динение гемового фрагмента, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, сшивание, циклизация, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных сшивок, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование якоря GPI (гликозилфосфатидилинозитол), гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристилирование, окисление, протеолитическая обработка, фосфорилирование, пренилирование, рацемизация, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное тРНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование и убиквитинирование.

Модификации осуществляют в любом месте в связывающих ВСМА белках, описанных в настоящем документе, включая в себя пептидный остов, аминокислотные боковые цепи и амино- или карбоксильный конец. Определенные обычные модификации пептидов, которые могут являться применимыми для модификации связывающих ВСМА белков, включают в себя гликозилирование, присоединение липида, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксилирование, блокирование амино- или карбоксильной группы в полипептиде или обеих групп, путем ковалентной модификации, и АДФ-рибозилирование.

Полинуклеотиды, кодирующие связывающие ВСМА белки.

Кроме того, согласно некоторым вариантам осуществления предусмотрены полинуклеотидные молекулы, кодирующие связывающий ВСМА белок, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотидные молекулы предусмотрены в виде конструкторов ДНК. Согласно другим вариантам осуществления полинуклеотидные молекулы предусмотрены в виде транскриптов матричной РНК.

Полинуклеотидные молекулы конструируют с помощью известных способов, например, путем объединения генов, кодирующих связывающий ВСМА белок, функционально связанный с подходящим промотором и необязательно подходящим терминатором транскрипции, и экспрессии его в бактериях или другой подходящей экспрессионной системе, такой как, например, клетки CHO.

Согласно некоторым вариантам осуществления полинуклеотид вставлен в вектор, предпочтительно экспрессионный вектор, который представляет дополнительный вариант осуществления. Этот рекомбинантный вектор можно сконструировать согласно известным способам. Представляющие особый интерес векторы включают в себя плазмиды, фагемиды, производные фагов, вирусы (например, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, лентивирусы и тому подобное) и космиды.

Для экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид описанного связывающего ВСМА белка можно использовать множество систем экспрессионный вектор/хозяин. Примерами экспрессионных векторов для экспрессии в *E. coli* являются pSKK (Le Gall et al., J. Immunol Methods. (2004) 285(1): 111-27), pcDNA5 (Invitrogen) для экспрессии в клетках млекопитающих, дрожжевые системы экспрессии PICHIAPIK™ (Invitrogen), бакуловирусовая система экспрессии BACUVANCE™ (GenScript).

Таким образом, связывающие ВСМА белки, как описано в настоящем документе, согласно некоторым вариантам осуществления получают путем введения вектора, кодирующего белок, как описано выше, в клетку-хозяина и культивирования указанной клетки-хозяина в условиях, в которых белковые домены экспрессируются, могут быть выделены и необязательно дополнительно очищены.

Фармацевтические композиции.

Кроме того, согласно некоторым вариантам осуществления предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие связывающий ВСМА белок, описанный в настоящем документе, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид связывающих ВСМА белков, или клетку-хозяина, трансформированную этим вектором, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя без ограничения любой носитель, который не влияет на эффективность биологической активности ингредиентов и который не токсичен для пациента, которому его вводят. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя физиологические растворы с фосфатным буфером, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло-в-воде, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.д. Такие носители можно составить с помощью общепринятых способов и можно вводить субъекту в подходящей дозе. Предпочтительно композиции являются стерильными. Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов. Дополнительный вариант осуществления относится к одному или более из описанных выше связывающих белков, таким как однодоменные антитела к ВСМА или их антигенсвязывающие фрагменты, упакованные в лиофилизированной форме или упакованные в водной среде.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтических композиций связывающий ВСМА белок, описанный в настоящем документе, инкапсулирован в наночастицы. Согласно некоторым вариантам осуществления наночастицы представляют собой фуллерены, жидкие кристаллы, липосомы, квантовые точки, суперпарамагнитные наночастицы, дендримеры или наностержни. Согласно другим вариантам осуществления фармацевтических композиций связывающий ВСМА белок прикреплен к ли-

посомам. В некоторых случаях связывающий ВСМА белок конъюгирован с поверхностью липосом. В некоторых случаях связывающий ВСМА белок инкапсулирован в оболочку липосомы. В некоторых случаях липосома представляет собой катионную липосому.

Связывающие ВСМА белки, описанные в настоящем документе, предусмотрены для применения в качестве лекарственного средства. Введение осуществляется различными путями, например путем внутривенного, внутрибрюшинного, подкожного, внутримышечного, местного или внутрикожного введения. Согласно некоторым вариантам осуществления путь введения зависит от вида терапии и вида соединения, содержащегося в фармацевтической композиции. Схема введения доз будет определяться лечащим врачом и другими клиническими факторами. Дозировки для любого одного пациента зависят от многих факторов, включая в себя размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, пол, конкретное соединение, которое следует вводить, время и путь введения, вид терапии, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, вводимые одновременно. "Эффективная доза" относится к количествам активного ингредиента, достаточным для воздействия на течение и тяжесть заболевания, которое приводит к снижению или ремиссии такой патологии, и может быть определена с использованием известных способов.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие ВСМА белки согласно настоящему раскрытию вводят в дозировке, составляющей вплоть до 10 мг/кг с частотой, составляющей один раз в неделю. В некоторых случаях дозировка находится в диапазоне от около 1 нг/кг до около 10 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления доза составляет около 1 нг/кг - около 10 нг/кг, около 5 нг/кг - около 15 нг/кг, около 12 нг/кг - около 20 нг/кг, около 18 нг/кг - около 30 нг/кг, около 25 нг/кг - около 50 нг/кг, около 35 нг/кг - около 60 нг/кг, около 45 нг/кг - около 70 нг/кг, около 65 нг/кг - около 85 нг/кг, около 80 нг/кг - около 1 мкг/кг, около 0,5 мкг/кг - около 5 мкг/кг, около 2 мкг/кг - около 10 мкг/кг, около 7 мкг/кг - около 15 мкг/кг, около 12 мкг/кг - около 25 мкг/кг, около 20 мкг/кг - около 50 мкг/кг, около 35 мкг/кг - около 70 мкг/кг, около 45 мкг/кг - около 80 мкг/кг, около 65 мкг/кг - около 90 мкг/кг, около 85 мкг/кг - около 0,1 мг/кг, около 0,095 мг/кг - около 10 мг/кг. В некоторых случаях дозировка составляет около 0,1 мг/кг - около 0,2 мг/кг; около 0,25 мг/кг - около 0,5 мг/кг, около 0,45 мг/кг - около 1 мг/кг, около 0,75 мг/кг - около 3 мг/кг, около 2,5 мг/кг - около 4 мг/кг, около 3,5 мг/кг - около 5 мг/кг, около 4,5 мг/кг - около 6 мг/кг, около 5,5 мг/кг - около 7 мг/кг, около 6,5 мг/кг - около 8 мг/кг, около 7,5 мг/кг - около 9 мг/кг или около 8,5 мг/кг - около 10 мг/кг. Частота введения согласно некоторым вариантам осуществления составляет приблизительно меньше чем один раз в день, через день, меньше чем один раз в день, дважды в неделю, один раз в неделю, один раз в 7 дней, один раз в две недели, раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели или один раз в месяц. В некоторых случаях частота введения составляет один раз в неделю. В некоторых случаях частота введения составляет один раз в неделю, и дозировка составляет вплоть до 10 мг/кг. В некоторых случаях продолжительность введения составляет от приблизительно 1 дня до приблизительно 4 недель или дольше.

Способы лечения.

Кроме того, в настоящем документе согласно некоторым вариантам осуществления предусмотрены способы и применения для стимуляции иммунной системы индивидуума, нуждающегося в этом, предусматривающие введение связывающего ВСМА белка, как описано в настоящем документе. В некоторых случаях введение связывающего ВСМА белка, описанного в настоящем документе, индуцирует и/или поддерживает цитотоксичность по отношению к клетке, экспрессирующей целевой антиген. В некоторых случаях клетка, экспрессирующая целевой антиген, представляет собой окончательно дифференцированную В-клетку, которая представляет собой раковую или опухолевую клетку, или метастатическую раковую или опухолевую клетку.

Кроме того, в настоящем документе предусмотрены способы и применения для лечения заболевания, нарушения или состояния, ассоциированного с ВСМА, предусматривающие введение индивидууму, нуждающемуся в этом, связывающего ВСМА белка или мультиспецифического связывающего белка, содержащего связывающий ВСМА белок, описанный в настоящем документе.

Заболевания, нарушения или состояния, ассоциированные с ВСМА, включают в себя без ограничения рак или метастаз, который происходит от В-клеток.

Формы рака, которые можно лечить, предотвращать или контролировать с помощью связывающих ВСМА белков согласно настоящему раскрытию и способов их применения, включают в себя без ограничения первичный рак или метастатический рак.

Примеры таких лейкозов включают в себя без ограничения: острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелоидный лейкоз (CML), а также ряд менее распространенных типов, таких как, например, волосатоклеточный лейкоз (HCL), Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (Т-PLL), лейкоз из больших зернистых лимфоцитов и Т-клеточный лейкоз взрослых и т.д. Подтипы острого лимфобластного лейкоза (ALL), подлежащие лечению, включают в себя без ограничения: острый В-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников, острый Т-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников, лейкоз Беркитта и острый бифенотипический лейкоз. Подтипы хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), подлежащие лечению, включают в себя без ограничения В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз. Подтипы острого

миелогенного лейкоза (AML), подлежащие лечению, включают в себя без ограничения острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелобластный лейкоз и острый мегакариобластный лейкоз. Подтипы хронического миелогенного лейкоза (CML), подлежащие лечению, включают в себя без ограничения хронический миеломоноцитарный лейкоз.

Примеры лимфомы, подлежащей лечению указанными способами, включают в себя без ограничения ходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому или любой подтип лимфомы.

Примеры таких множественных миелом включают в себя без ограничения множественную миелому кости или других тканей, включая в себя, например, "тлеющую" множественную миелому, несекреторную миелому, остеосклеротическую миелому и т.д.

Обзор таких нарушений см. в Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America.

Согласно некоторым вариантам осуществления используемые в настоящем документе термин "лечение" или "осуществление лечения" или "получивший лечение" относится к терапевтическому лечению, при котором целью является замедление (уменьшение) нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания или получение благоприятных или требуемых клинических результатов. Для целей, описанных в настоящем документе, благоприятные или требуемые клинические результаты включают в себя без ограничения следующее: облегчение симптомов; уменьшение степени состояния, нарушения или заболевания; стабилизация (т.е. не ухудшение) состояния нарушения, состояния или заболевания; задержка начала или замедление прогрессирования состояния, нарушения или заболевания; уменьшение интенсивности состояния, нарушения или болезненного состояния; и ремиссия (частичная или полная), обнаруживаемая или не обнаруживаемая, или улучшение состояния, нарушения или заболевания. Лечение включает в себя стимуляцию клинически значимого ответа без чрезмерных уровней побочных эффектов. Лечение также включает в себя продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью, если лечение не проводится. Согласно другим вариантам осуществления "лечение" или "осуществление лечения" или "получивший лечение" относится к профилактическим мерам, в которых цель состоит в том, чтобы отсрочить наступление или уменьшить тяжесть нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания, например, у человека, который предрасположен к заболеванию (например, человек, который несет генетический маркер для заболевания, такого как рак молочной железы).

Согласно некоторым вариантам осуществления способов, описанных в настоящем документе, связывающие ВСМА белки, как описано в настоящем документе, вводят в комбинации со средством для лечения конкретного заболевания, нарушения или состояния. Средства включают в себя без ограничения терапию, включающую в себя антитела, малые молекулы (например, химиотерапевтические средства), гормоны (стероидные, пептидные и т.п.), лучевую терапию ( $\gamma$ -лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоизотопов, микроволны, УФ-излучение и тому подобное), генную терапию (например, антисмысловая, ретровирусная терапия и тому подобное) и другие виды иммунотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок, как описано в настоящем документе, вводят в комбинации с антидиарейными средствами, противорвотными средствами, анальгетиками, опиоидами и/или нестероидными противовоспалительными средствами. Согласно некоторым вариантам осуществления связывающий ВСМА белок, как описано в настоящем документе, вводят в комбинации с противораковыми средствами. Неограничивающие примеры противораковых средств, которые можно использовать в различных вариантах осуществления согласно настоящему раскрытию, включая в себя фармацевтические композиции и лекарственные формы и наборы согласно настоящему раскрытию, включают в себя следующее: активин; акларубин; актодол гидрохлорид; акронин; адозелзин; альдеслейкин; алтретамин; амбомин; аметантрон ацетат; аминоклутетимид; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназа; асперлин; азацитидин; азетеп; азотомин; батимастат; бензодепа; бикалутамид; бисантрон гидрохлорид; биснафид димезилат; бизелезин; блеомицин сульфат; бреквинар натрия; бропиримин; бусульфат; кактиномицин; калустерон; карацемид; карбетимер; карбоплатин; кармустин; карубин гидрохлорид; карзелезин; цедефингол; хлорамбуцил; циролемицин; цисплатин; кладрибин; криснатол мезилат; циклофосфамид; цитарабин; дакарбазин; дактиномицин; даунорубин гидрохлорид; децитабин; дексормеплатин; дезагуанин; дезагуанин мезилат; диазиквон; доцетаксел; доксорубин; доксорубин гидрохлорид; дролоксифен; дролоксифена цитрат; дромостанолон пропионат; дуазомицин; эдатрексат; эфлорнитин гидрохлорид; элсамитруцин; энлоплатин; энпромаг; эпипропидин; эпирубин гидрохлорид; эрбулозол; эзорубин гидрохлорид; эстрамустин; эстрамустин натрия фосфат; этанидазол; этопозид; этопозид фосфат; этоприн; фадрозол гидрохлорид; фазарабин; фенретирид; флоксурин; флударабин фосфат; фторурацил; флуоритабин; фосквидон; фостриecin натрия; гемцитабин; гемцитабин гидрохлорид; гидроксимочевина; идарубин гидрохлорид; ифосфамид; илмофозин; интерлейкин II (включая в себя рекомбинантный интерлейкин II, или rIL2), интерферон альфа-2a; интерферон альфа-2b; интерферон альфа-n1; интерферон альфа-n3; интерферон бета-1a; интерферон гамма-1b; ипроплатин; иринотекан гидрохлорид; лантеотид ацетат; лектрозол; леупролид ацетат; лиарозол гидрохлорид; лометрексол натрия; ломустин; лозоксантрон гидрохлорид; мазопрокол; майтанзин; мехлорэта-

мин гидрохлорид; магестрол ацетат; меленгестрол ацетат; мелфалан; меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат натрий; метоприн; метуредеп; митиндомид; митокарцин; митокромин; митогиллин; митомалцин; митомицин; митоспер; митотан; митоксантрон гидрохлорид; микофеноловая кислота; нокодазол; ногаламицин; ормаплатин; оксисуран; паклитаксел; пегаспаргаза; пелиомицин; пентамустин; пепломицин сульфат; перфосфамид; пипоброман; пипосульфат; пироксантрон гидрохлорид; пликамицин; пломестан; порфимер натрий; порфирамицин; преднемустин; прокарбазин гидрохлорид; пуромицин; пуромицин гидрохлорид; пиразофурин; рибоприн; роглетимид; сафингол; сафингол гидрохлорид; семустин; симтразен; спарфосат натрий; спарсомицин; спирогерманий гидрохлорид; спиромустин; спиролатин; стрептоницин; стрептозоцин; сулофенур; тализомицин; текогалан натрий; тегафур; телоксантрон гидрохлорид; темопорфин; тенипозид; тероксирон; тестолактон; тиамиприн; тиогуанин; тиотепа; тиазофурин; тирапазамин; торемифен цитрат; трестолон ацетат; трицирибин фосфат; триметрексат; триметрексат глюкуронат; трипторелин; тубулозол гидрохлорид; урацил иприт; уредеп; вапреотид; вертепорфин; винбластин сульфат; винкристин сульфат; виндезин; виндезин сульфат; винепидин сульфат; винглицинат сульфат; винлеуризин сульфат; винорелбин тартрат; винрозицин сульфат; винзолидин сульфат; ворозол; зениплатин; зиностаин; зорубицин гидрохлорид. Другие примеры противораковых лекарственных средств включают в себя без ограничения следующее: 20-эпи-1,25-дигидроксивитамины D3; 5-этинилурацил; абиратерон; акларубин; ацилфулвен; аденипенон; адозелезин; алдеслейкин; антагонисты ALL-TK; алтретамин; амбамустин; амидокс; амифостин; аминоклевулиновая кислота; амрубицин; амсакрин; анагрелид; анастрозол; андрографолид; ингибиторы ангиогенеза; антагонист D; антагонист G; антареликс; антидорсализирующий морфогенный белок-1; антиандроген против карциномы предстательной железы; антиэстроген; антинеопластон; антисмысловые олигонуклеотиды; афидиколин глицинат; модуляторы генов апоптоза; регуляторы апоптоза; апуриновая кислота; ага-CDP-DL-PTBA; аргининдезаминаза; асулаклин; атаместан; атримустин; аксинастатин 1; аксинастатин 2; аксинастатин 3; азастерон; азатоксин; азатиридин; производные баккатина III; баланол; батимастат; антагонисты BCR/ABL; бензохлорины; бензоилстауроспорин; производные бета-лактамов; бета-алетин; бетакламицин B; бетулиновая кислота; ингибитор bFGF; бикалутамид; бисантрон; бисазиридинилспермин; биснафид; бистратен A; бизелезин; брелфат; бропиримин; будотитан; бутионин сулофоксимин; кальципотриол; кальфостин C; производные камптотецина; канапирокс IL-2; капецитабин; карбоксамидаминотриазол; карбоксамидаминотриазол; CaRest M3; CARN 700; происходящий из хряща ингибитор; карзелезин; ингибиторы казеинкиназы (ICOS); кастаноспермин; цекропин B; цетрореликс; хлорины; хлорхиноксалин сульфонамид; цикапрост; цис-порфирилин; кладрибин; аналоги кломифена; клотримазол; коллисмидин A; коллисмидин B; комбретастатин A4; аналог комбретастатины; конагенин; крамбесцидин 816; криснатол; криптофицин 8; производные криптофицина A; курацин A; циклопентантрахиноны; циклоплатам; ципемидин; цитарабин оксифосфат; цитолитический фактор; цитостатин; дакликсимаб; децитабин; дегидродидемнин B; деслорелин; дексаметазон; дексифосфамид; дексразоксан; дексверапамил; диализон; дидемнин B; дидокс; диэтилнормспермин; дигидро-5-азацитидин; дигидротаксол, 9-диоксамидин; дифенилспиромустин; доцетаксел; доказанол; долазетрон; доксифлуридин; дролоксифен; дронабинол; дуокармицин SA; эбселен; экомустин; эдельфозин; эдрекломаб; эфлорнитин; элемен; эмифур; эпирубицин; эпиритерид; аналог эстрамустина; агонисты эстрогенов; антагонисты эстрогенов; этанидазол; этопозид фосфат; экземестан; фадрозол; фазарабин; фенретинид; филграстин; финастерид; флавопиридол; флезеластин; флуастерон; флударабин; фтордауноруницин гидрохлорид; форфенимекс; форместан; фостриецин; фотемустин; гадолиния тексафирин; нитрат галлия; галоцитабин; ганиреликс; ингибиторы желатиназы; гемцитабин; ингибиторы глутатиона; гепсульфам; херегулин; гексаметилен бисацетамид; гиперидин; ибандроновая кислота; идарубицин; идоксифен; идрамантон; илмофозин; иломастат; имидазоакридоны; имиквимод; иммуностимулирующие пептиды; ингибитор рецептора инсулиноподобного фактора роста-1; агонисты интерферона; интерфероны; интерлейкины; иобенгуан; йододоксорибицин; ипомеанол, 4-ироплакт; ирсогладин; изобенгазол; изогомохаликондрин B; итасетрон; ясплакинолид; кагалалид F; ламелларин-N триацетат; лантеотид; леинамицин; ленограстин; лентинан сульфат; лептолстатин; лектрозол; ингибирующий фактор лейкоза; альфа-интерферон лейкоцитов; леупролид+эстроген+прогестерон; леупрорелин; левамизол; лиарозол; линейный аналог полиамина; липофильный дисахаридный пептид; липофильные соединения платины; лиссоклинамид 7; лоблаплатин; ломбрицин; лометрексол; лонидамин; лозоксантрон; ингибитор HMG-CoA-редуктазы (такой как без ограничения ловастатин, правастатин, флувастатин, статин, симвастатин и аторвастатин); локсорибин; луртотекан; лутетий тексафирин; лизофиллин; литические пептиды; майтанзин; манностатин A; маримастат; мазопрокол; маспин; ингибиторы матрилизина; ингибиторы матриксных металлопротеиназ; меногарил; мербарон; метерелин; метионидаза; метоклопрамид; ингибитор MIF; мифепристон; милтефозин; миримостим; двухцепочечная РНК с несовпадающими основаниями; митогуазон; митолактон; аналоги митомицина; митонафид; митотоксиновый фибробластный фактор роста-сапорин; митоксантрон; мофаротен; молграмостим; моноклональное антитело, хорионический гонадотропин человека; монофосфорилилипид A+sk клеточной стенки микобактерий; мопидамон; ингибитор множественной устойчивости к лекарственным средствам; терапия на основе множественного супрессора опухолей 1; противораковое средство на основе иприта; микапероксид B; экстракт клеточной стенки микобактерий; мирапорон; N-

ацетилдиналин; N-замещенные бензамиды; нафарелин; нагрестип; налоксон+пентазоцин; напавин; нафтерпин; нартограстим; недаплатин; неморубицин; неридроновая кислота; нейтральная эндопептидаза; нилутамид; низамицин; модуляторы оксида азота; нитроксидный антиоксидант; нитруллин; Оббензилгуанин; октреотид; окиценон; олигонуклеотиды; онапристон; ондансетрон; ондансетрон; орацин; пероральный индуктор цитокинов; ормаплатин; осатерон; оксалиплатин; оксауномицин; паклитаксел; аналоги паклитаксела; производные паклитаксела; палауамин; пальмитоилтризоксин; памидроновая кислота; панакситриол; паномифен; парабактин; пазеллиптин; пегаспаргаза; пелдезин; пентосан полисульфат натрия; пентостатин; пентрозол; перфлуброн; перфосфамид; периллиловый спирт; феназиномицин; фенилацетат; ингибиторы фосфатазы; пицибанил; пилокарпин гидрохлорид; пирарубицин; пиритрексим; плацетин А; плацетин В; ингибитор активатора плазминогена; комплекс платины; соединения платины; комплекс платины-триамина; порфимер натрий; порфирамицин; преднизон; пропил-бис-акридон; простагландин J2; ингибиторы протеасом; иммунный модулятор на основе белка А; ингибитор протеинкиназы С; ингибиторы протеинкиназы С, микроалгал; ингибиторы протеинтирозинфосфатазы; ингибиторы пурин-нуклеозидфосфорилазы; пурпурины; пиразолоакридин; конъюгат пиридоксильированного гемоглобина и полиоксизтилена; антагонисты *raf*; ралтитрексед; рамосетрон; ингибиторы фарнезилпротеин-трансферазы *ras*; ингибиторы *ras*; ингибитор *ras*-GAP; деметилированный ретеллиптин; этидронат рения Re 186; ризоксин; рибозимы; RII ретинамид; роглетимид; рокситукин; ромуртид; роквинимекс; рубигинон В1; рубоксил; сафингол; саинтопин; SarCNU; саркофитол А; сарграмостим; миметики Sdi 1; сему-стин; образующийся при старении ингибитор 1; смысловые олигонуклеотиды; ингибиторы передачи сигнала; модуляторы передачи сигнала; одноцепочечный антигенсвязывающий белок; сизофиран; собу-зоксан; натрий борокаптит; натрий фенилацетат; солверол; связывающий соматомедин белок; сонермин; спарфозовая кислота; спикамицин D; спиромустин; спленопентин; спонгистатин 1; скваламин; ингиби-тор стволовых клеток; ингибиторы деления стволовых клеток; стрипиамид; ингибиторы стромелизина; сульфмосин; антагонист суперактивного вазоактивного интестинального пептида; сурадиаста; сурамин; свайнсонин; синтетические гликозаминогликаны; таллимустин; тамоксифен метйодид; тауромустин; та-заротен; текогалан натрий; тегафур; теллурапирилий; ингибиторы теломеразы; темпорфин; темозоло-мид; тенипозид; тетрахлордекаоксид; тетразомин; талибластин; тиокоралин; тромбopoэтин; миметик тромбopoэтина; тималфазин; агонист рецептора тимопоэтина; тимотринан; тиреостимулирующий гор-мон; этилэтиопурпурин олова; тирапазамин; титаноцен бихлорид; топсентин; торемифен; фактор тотипо-тентных стволовых клеток; ингибиторы трансляции; третинин; триацетилюридин; трицирибин; тримет-рексам; трипторелин; трописетрон; туростерид; ингибиторы тирозинкиназы; тирфостины; ингибиторы UBC; убенимекс; происходящий из мочеполювого синуса ингибирующий рост фактор; антагонисты ре-цептора урокиназы; вапреотид; вариолин В; эритроцитарная генная терапия векторной системой; веларе-сол; верамин; вердины; вертепорфин; винорелбин; винксалтин; VITAXIN® (витаксин); ворозол; заноте-рон; зениплатин; зиласкорб и зиностатин стимуламер. Дополнительными противораковыми лекарствен-ными средствами являются 5-фторурацил и лейковорин. Указанные два средства являются особенно применимыми при использовании в способах, предусматривающих применение талидомида и ингибито-ра топоизомеразы. Согласно некоторым вариантам осуществления однодоменные связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию используют в комбинации с гемцитабином.

Согласно некоторым вариантам осуществления связывающие ВСМА белки, как описано в настоя-щем документе, вводят до, во время или после операции.

Согласно некоторым вариантам осуществления противораковое средство конъюгировано посредст-вом любого подходящего средства с триспецифическим белком.

Способы обнаружения экспрессии ВСМА и диагностики ассоциированного с ВСМА рака.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения предусмотрены наборы для обнаружения экспрессии ВСМА *in vitro* или *in vivo*. Наборы включают в себя вышеупомянутые связы-вающие ВСМА белки (например, меченое однодоменное антитело к ВСМА или его антигенсвязывающие фрагменты) и одно или более соединений для обнаружения метки. Согласно некоторым вариантам осу-ществления метка выбрана из группы, состоящей из флуоресцентной метки, ферментной метки, радиоак-тивной метки, активной метки ядерного магнитного резонанса, люминесцентной метки и хромофорной метки.

В некоторых случаях экспрессию ВСМА обнаруживают в биологическом образце. Образец может представлять собой любой образец, включая в себя без ограничения образцы ткани из биопсий, вскрытий и образцы патологических исследований. Биологические образцы также включают в себя срезы тканей, например, замороженные срезы, взятые для гистологических целей. Биологические образцы дополни-тельно включают в себя жидкости организма, такие как кровь, сыворотка, плазма, мокрота, спинномоз-говая жидкость или моча. Биологический образец, как правило, получают от млекопитающего, такого как человек или примат, не являющийся человеком.

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен способ определения того, характеризуе-ся ли субъект наличием рака, путем приведения в контакт образца от субъекта с однодоменным антителом к ВСМА, как раскрыто в настоящем документе; и обнаружение связывания однодоменного антитела с образцом. Увеличение связывания антитела с образцом по сравнению со связыванием антитела с кон-

трольным образцом идентифицирует субъекта как характеризующегося наличием рака.

Согласно другому варианту осуществления предоставлен способ подтверждения диагноза рака у субъекта путем приведения в контакт образца от субъекта, у которого диагностирован рак, с однодоменным антителом к ВСМА, как раскрыто в настоящем документе; и обнаружение связывания антитела с образцом. Увеличение связывания антитела с образцом по сравнению со связыванием антитела с контрольным образцом подтверждает диагноз рака у субъекта.

В некоторых примерах раскрытых способов однодоменное антитело метят напрямую.

В некоторых примерах способы дополнительно предусматривают приведение в контакт второго антитела, которое специфически связывается с однодоменным антителом, с образцом; и обнаружение связывания второго антитела. Увеличение связывания второго антитела с образцом по сравнению со связыванием второго антитела с контрольным образцом выявляет рак у субъекта или подтверждает диагноз рака у субъекта.

В некоторых случаях рак представляет собой лимфому, лейкоз или множественную миелому.

В некоторых примерах контрольный образец представляет собой образец от субъекта без рака. Согласно конкретным примерам образец представляет собой образец крови или ткани.

В некоторых случаях антитело, которое связывает (например, специфически связывает) ВСМА, напрямую метят детектируемой меткой. Согласно другому варианту осуществления антитело, которое связывает (например, специфически связывает) ВСМА (первое антитело), является немеченым, и метят второе антитело или другую молекулу, которая может связывать антитело, которое специфически связывает ВСМА. Второе антитело выбрано таким, чтобы оно могло специфически связывать конкретный вид и класс первого антитела. Например, если первое антитело представляет собой IgG лампы, тогда вторичное антитело может представлять собой антитело к IgG лампы. Другие молекулы, которые могут связываться с антителами, включают в себя без ограничения белок А и белок G, оба из которых являются коммерчески доступными. Подходящие метки для антитела или вторичного антитела описаны выше и включают в себя различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы, магнитные агенты и радиоактивные материалы. Неограничивающие примеры подходящих ферментов включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу или ацетилхолинэстеразу. Неограничивающие примеры подходящих комплексов простетических групп включают в себя стрептавидин/биотин и авидин/биотин. Неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных материалов включают в себя умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлор-триазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин. Неограничивающим иллюстративным люминесцентным материалом является люминол; неограничивающим иллюстративным магнитным агентом является гадолиний, а неограничивающие иллюстративные радиоактивные метки включают в себя <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S или <sup>3</sup>H.

Согласно альтернативному варианту осуществления ВСМА можно анализировать в биологическом образце с помощью конкурентного иммуноанализа с использованием стандартов ВСМА, меченных детектируемым веществом, и немеченого антитела, которое специфически связывает ВСМА. В этом анализе объединяют биологический образец, меченые стандарты ВСМА и антитело, которое специфически связывает ВСМА, и определяют количество меченого стандарта ВСМА, связанного с немеченым антителом. Количество ВСМА в биологическом образце обратно пропорционально количеству меченого стандарта ВСМА, связанного с антителом, которое специфически связывает ВСМА.

Иммуноанализ и способ, раскрытые в настоящем документе, можно использовать для ряда целей. Согласно одному варианту осуществления антитело, которое специфически связывает ВСМА, можно использовать для обнаружения продукции ВСМА в клетках в клеточной культуре. Согласно другому варианту осуществления антитело можно использовать для определения количества ВСМА в биологическом образце, таком как образец ткани или образец крови или сыворотки. В некоторых примерах ВСМА представляет собой ВСМА клеточной поверхности. В других примерах ВСМА представляет собой растворимый ВСМА (например, ВСМА в супернатанте клеточной культуры или растворимый ВСМА в образце жидкости организма, таком как образец крови или сыворотки).

Согласно одному варианту осуществления предусмотрен набор для обнаружения ВСМА в биологическом образце, таком как образец крови или образец ткани. Например, чтобы подтвердить диагноз рака у субъекта, можно выполнить биопсию для получения образца ткани для гистологического исследования. Альтернативно, образец крови можно получить для обнаружения присутствия растворимого белка ВСМА или его фрагмента. Наборы для обнаружения полипептида, как правило, содержат однодоменное антитело, согласно настоящему раскрытию, которое специфически связывает ВСМА. Согласно некоторым вариантам осуществления в набор включен фрагмент антитела, такой как фрагмент scFv, домен VH или Fab. Согласно дополнительному варианту осуществления антитело метят (например, флуоресцентной, радиоактивной или ферментативной меткой).

Согласно одному варианту осуществления набор включает в себя инструктивные материалы, раскрывающие способы применения антитела, связывающего ВСМА. Инструктивные материалы могут быть написаны, могут быть предоставлены в электронной форме (такой как компьютерная дискета или компакт-диск) или могут быть визуальными (например, видеофайлы), или предоставлены через элек-

тронную сеть, например, через интернет, всемирную сеть, внутреннюю сеть или другую сеть. Наборы могут также включать в себя дополнительные компоненты для облегчения конкретного применения, для которого предназначен набор. Таким образом, например, набор может дополнительно содержать средства обнаружения метки (например, ферментные субстраты для ферментативных меток, наборы фильтров для обнаружения флуоресцентных меток, соответствующие вторичные метки, такие как вторичное анти-тело или тому подобное). Наборы могут дополнительно включать в себя буферы и другие реагенты, обычно используемые для осуществления на практике конкретного способа. Такие наборы и соответствующее содержимое хорошо известны специалистам в настоящей области техники.

Согласно одному варианту осуществления диагностический набор содержит иммуноанализ. Хотя детали иммуноанализа могут варьироваться в зависимости от конкретного используемого формата, способ обнаружения ВСМА в биологическом образце, как правило, предусматривает стадии контакта биологического образца с антителом, которое специфически реагирует в иммунологически реактивных условиях с полипептидом ВСМА. Антитело может специфически связываться в иммунологически реактивных условиях с образованием иммунного комплекса, и присутствие иммунного комплекса (связанного антитела) обнаруживают прямо или косвенно.

Способы определения наличия или отсутствия маркера клеточной поверхности хорошо известны в настоящей области техники. Например, антитела могут быть конъюгированы с другими соединениями, включая в себя без ограничения ферменты, магнитные гранулы, коллоидные магнитные гранулы, гаптены, флуорохромы, соединения металлов, радиоактивные соединения или лекарственные средства. Антитела также можно использовать в иммуноанализах, таких как без ограничения радиоиммунологические анализы (RIA), ELISA или иммуногистохимические анализы. Антитела также можно использовать для активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS). FACS использует множество цветовых каналов, каналов обнаружения с малоугловым светорассеиванием и светорассеиванием под тупым углом светорассеиванием и каналов импеданса, среди других более сложных уровней обнаружения, для разделения или сортировки клеток (см. патент США № 5061620). Любое из однодоменных антител, которые связывают ВСМА, как описано в настоящем документе, можно использовать в этих анализах. Таким образом, антитела можно использовать в обычном иммуноанализе, включая в себя без ограничения ELISA, RIA, FACS, тканевую иммуногистохимию, вестерн-блот или иммунопреципитацию.

### Примеры

Настоящая заявка может быть более понята посредством ссылки на следующие неограничивающие примеры, которые представлены в качестве иллюстративных вариантов осуществления настоящей заявки. Следующие примеры представлены для того, чтобы более полно проиллюстрировать варианты осуществления, и их никоим образом не следует истолковывать как ограничивающие широкий объем настоящей заявки.

#### Пример 1.

Способность иллюстративного триспецифического доменного антитела к ВСМА, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, опосредовать Т-клеточное уничтожение раковых клеток, экспрессирующих ВСМА, в анализах TDCC (зависимая от Т-клеток клеточная цитотоксичность).

#### Получение белков.

Последовательности нацеленных на ВСМА триспецифических молекул, содержащих связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, клонировали в экспрессирующий вектор pcDNA 3.4 млекопитающих (Invitrogen), им предшествовала лидерная последовательность, и затем следовала 6-гистидиновая метка (SEQ ID NO: 471). Клетки Expi293 (Life Technologies A14527) содержали в суспензии в колбах для оптимального роста (Optimum Growth Flasks) (Thomson) в диапазоне от 0,2 до  $8 \times 10^6$  клеток/мл в среде Expi293. Очищенную плазмидную ДНК трансфицировали в клетки Expi293 в соответствии с протоколами набора экспрессионной системы Expi293 (Life Technologies, A14635) и выдерживали в течение 4-6 дней после трансфекции. Количество исследуемых иллюстративных триспецифических белков в кондиционированной среде, из трансфицированных клеток Expi293 количественно определяли с использованием прибора Octet с наконечниками с белком А и с использованием контрольного триспецифического белка для стандартной кривой.

#### Анализы зависимой от Т-клеток клеточной цитотоксичности.

Титры кондиционированной среды добавляли в анализы TDCC (анализы зависимой от Т-клеток клеточной цитотоксичности), чтобы оценить, способно ли однодоменное антитело к ВСМА формировать синапс между Т-клетками и экспрессирующей ВСМА клеточной линией и направлять Т-клетки, чтобы уничтожить экспрессирующую ВСМА клеточную линию. В этом анализе (Nazarian et al., 2015. J. Biomol. Screen., 20:519-27) Т-клетки и целевые клетки клеточной линии рака смешивали вместе в соотношении 10:1 в 384-луночном планшете, и добавляли различные количества исследуемых триспецифических белков. Линии опухолевых клеток сконструировали для экспрессии белка люциферазы. Через 48 ч для количественного определения оставшихся жизнеспособных опухолевых клеток использовали люминесцентный анализ STEADY-GLO® (Promega).



В этом примере использовали клетки ЕJM, которые представляют собой клеточную линию, которая служит моделью *in vitro* для множественной миеломы и плазмоклеточного лейкоза. Жизнеспособность клеток ЕJM измеряли через 48 ч. Было видно, что триспецифические белки опосредуют Т-клеточное уничтожение. На фиг. 1 показан пример анализа жизнеспособности клеток с исследуемыми белками 01H08, 01F07, 02F02 и BH253 по сравнению с отрицательным контролем. EC<sub>50</sub> для активности TDCC некоторых других исследуемых триспецифических белков перечислены ниже в табл. 1.

Аффинность связывания.

В настоящем исследовании определяли аффинность связывания с белком ВСМА человека нацеленных на ВСМА триспецифических белков, содержащих связывающий ВСМА белок, в соответствии с настоящим раскрытием. Измерения аффинности приведены в табл. 1.

Таблица 1  
Аффинность связывания и активность TDCC нескольких  
нацеленных на ВСМА триспецифических белков

| Название<br>конструкта | К <sub>D</sub><br>ВСМА<br>человека<br>(M) | EC <sub>50</sub> TDCC (M) |
|------------------------|-------------------------------------------|---------------------------|
| 253BH10                | 2,77E-08                                  | 5,29E-11                  |
| 01H08                  | 2,86E-09                                  | 3,41E-13                  |
| 01F07                  | 4,18E-09                                  | 7,02E-13                  |
| 01H06                  | ND                                        | 1,00E-12                  |
| 02G02                  | 5,26E-09                                  | 1,08E-12                  |
| 02B05                  | 5,39E-09                                  | 1,22E-12                  |
| 01C01                  | 6,52E-09                                  | 1,33E-12                  |
| 02F02                  | 6,73E-09                                  | 1,36E-12                  |
| 02E05                  | 6,53E-09                                  | 1,37E-12                  |
| 01E08                  | 5,56E-09                                  | 1,50E-12                  |
| 02C01                  | 5,31E-09                                  | 1,55E-12                  |
| 02E06                  | 6,31E-09                                  | 1,57E-12                  |
| 02B06                  | 6,77E-09                                  | 1,65E-12                  |
| 02F04                  | 6,75E-09                                  | 1,72E-12                  |
| 01G08                  | 6,27E-09                                  | 1,91E-12                  |
| 02C06                  | 6,90E-09                                  | 1,95E-12                  |
| 01H09                  | 5,44E-09                                  | 2,21E-12                  |
| 01F04                  | 6,55E-09                                  | 2,21E-12                  |
| 01D02                  | 7,35E-09                                  | 2,25E-12                  |
| 02D11                  | 6,71E-09                                  | 2,35E-12                  |
| 01A07                  | 6,95E-09                                  | 2,49E-12                  |
| 02C03                  | 7,09E-09                                  | 2,52E-12                  |
| 02F07                  | 7,06E-09                                  | 2,59E-12                  |
| 01E04                  | 7,29E-09                                  | 2,67E-12                  |
| 02H09                  | 6,83E-09                                  | 2,88E-12                  |
| 01E03                  | 6,36E-09                                  | 2,98E-12                  |
| 02F05                  | 7,15E-09                                  | 3,00E-12                  |
| 01B05                  | 6,52E-09                                  | 3,01E-12                  |

**043081**

|       |          |          |
|-------|----------|----------|
| 01C05 | 6,09E-09 | 3,07E-12 |
| 02F12 | 7,76E-09 | 3,14E-12 |
| 01H11 | 7,06E-09 | 3,17E-12 |
| 02G06 | 7,50E-09 | 3,39E-12 |
| 01E06 | 8,91E-09 | 3,77E-12 |
| 01G11 | 9,70E-09 | 3,98E-12 |
| 02A05 | 7,06E-09 | 4,21E-12 |
| 01A08 | 1,17E-08 | 4,25E-12 |
| 02G05 | 7,12E-09 | 4,33E-12 |
| 01B09 | 1,12E-08 | 5,27E-12 |
| 01G01 | 1,46E-08 | 5,83E-12 |
| 01B06 | 9,10E-09 | 6,97E-12 |
| 01F10 | 1,44E-08 | 7,44E-12 |
| 01E05 | 1,17E-08 | 1,08E-11 |
| 02G01 | 1,63E-08 | 1,08E-11 |
| 01A06 | 1,58E-08 | 1,10E-11 |
| 02B04 | 1,52E-08 | 1,13E-11 |
| 01D06 | 1,49E-08 | 1,35E-11 |
| 02B07 | 1,58E-08 | 1,42E-11 |
| 02B11 | 1,33E-08 | 1,44E-11 |
| 01H04 | 1,74E-08 | 1,47E-11 |
| 01D03 | 2,09E-08 | 1,49E-11 |
| 01A05 | 1,70E-08 | 1,51E-11 |
| 02F11 | 2,00E-08 | 1,52E-11 |
| 01D04 | 1,89E-08 | 1,60E-11 |
| 01B04 | 1,86E-08 | 1,61E-11 |
| 02C05 | 1,56E-08 | 1,62E-11 |
| 02E03 | 1,68E-08 | 1,65E-11 |
| 01D05 | 1,78E-08 | 1,66E-11 |
| 01C04 | 2,16E-08 | 1,75E-11 |

**043081**

|       |          |          |
|-------|----------|----------|
| 01E07 | 1,99E-08 | 1,92E-11 |
| 01G06 | 1,70E-08 | 1,92E-11 |
| 02F06 | 2,19E-08 | 1,93E-11 |
| 01B01 | 1,99E-08 | 1,95E-11 |
| 01D07 | 1,93E-08 | 1,96E-11 |
| 02A08 | 9,51E-09 | 2,01E-11 |
| 01A02 | 2,15E-08 | 2,18E-11 |
| 02G11 | 2,05E-08 | 2,38E-11 |
| 01G04 | 1,17E-08 | 2,41E-11 |
| 02F03 | 2,57E-08 | 2,45E-11 |
| 01C06 | 1,88E-08 | 2,51E-11 |
| 01A01 | 2,13E-08 | 2,64E-11 |
| 01B12 | 2,07E-08 | 2,73E-11 |
| 02A07 | 1,84E-08 | 2,79E-11 |
| 02G08 | 1,80E-08 | 2,86E-11 |
| 02E09 | 2,09E-08 | 3,11E-11 |
| 02H06 | 2,33E-08 | 3,19E-11 |
| 01H10 | 2,48E-08 | 3,52E-11 |
| 01F05 | 1,67E-08 | 3,72E-11 |
| 01C02 | 2,00E-08 | 3,73E-11 |
| 02A04 | 1,76E-08 | 3,82E-11 |
| 02H05 | 1,96E-08 | 3,89E-11 |
| 02G09 | 3,44E-08 | 3,96E-11 |
| 02D06 | 2,33E-08 | 4,28E-11 |
| 02G07 | 1,93E-08 | 4,46E-11 |
| 01H05 | 2,74E-08 | 4,54E-11 |
| 01C08 | 2,83E-08 | 4,57E-11 |
| 01A03 | 3,08E-08 | 4,61E-11 |
| 01A09 | 2,39E-08 | 4,84E-11 |
| 02B01 | 2,14E-08 | 5,18E-11 |

|       |          |          |
|-------|----------|----------|
| 02H01 | 3,56E-08 | 5,42E-11 |
| 02H04 | 3,11E-08 | 5,99E-11 |
| 02A11 | 2,52E-08 | 6,06E-11 |
| 01E10 | 1,85E-08 | 6,23E-11 |
| 02D09 | 2,89E-08 | 6,73E-11 |
| 01F08 | 2,14E-08 | 7,12E-11 |
| 01F03 | 1,50E-08 | 7,64E-11 |
| 02H11 | 2,75E-08 | 7,75E-11 |
| 01C07 | 1,98E-08 | 8,33E-11 |
| 01B08 | 2,56E-08 | 8,76E-11 |
| 01B03 | 2,62E-08 | 9,64E-11 |
| 01H01 | 3,59E-08 | 1,18E-10 |
| 02B12 | 2,52E-08 | 1,24E-10 |
| 01G10 | 4,19E-08 | 1,43E-10 |
| 01A04 | 3,75E-08 | 1,59E-10 |
| 01B07 | 4,39E-08 | 1,74E-10 |
| 01C10 | 4,64E-08 | 2,08E-10 |
| 01F02 | 4,13E-08 | 2,25E-10 |
| 01B02 | 1,88E-08 | 3,59E-10 |
| 01F12 | 4,05E-08 | 3,92E-10 |
| 01G09 | 8,78E-08 | 4,41E-10 |
| 01D10 | 5,39E-08 | 4,53E-10 |
| 01F09 | 5,28E-08 | 9,45E-10 |

ND: не определено.

#### Молекулы

01H08, 01F07, 01H06, 02G02, 02B05, 01C01, 02F02, 02E05, 01E08, 02C01, 02E06, 02B06, 02F04, 01G08, 02C06, 01H09, 01F04, 01D02, 02D11, 01A07, 02C03, 02F07, 01E04, 02H09, 01E03, 02F05, 01B05, 01C05, 02F12, 01H11, 02G06, 01E06, 01G11, 02A05, 01A08, 02G05, 01B09, 01G01, 01B06, 01F10, 01E05, 02G01, 01A06, 02B04, 01D06, 02B07, 02B11, 01H04, 01D03, 01A05, 02F11, 01D04, 01B04, 02C05, 02E03, 01D05, 01C04, 01E07, 01G06, 02F06, 01B01, 01D07, 02A08, 01A02, 02G11, 01G04, 02F03, 01C06, 01A01

характеризуются по меньшей мере двукратным увеличением активности TDCC, а также показывают увеличение аффинности по сравнению с молекулой с исходными CDR, 253BH10.

#### Молекулы

01H08, 01F07, 01H06, 02G02, 02B05, 01C01, 02F02, 02E05, 01E08, 02C01, 02E06, 02B06, 02F04, 01G08, 02C06, 01H09, 01F04, 01D02, 02D11, 01A07, 02C03, 02F07, 01E04, 02H09, 01E03, 02F05, 01B05, 01C05, 02F12, 01H11, 02G06, 01E06, 01G11, 02A05, 01A08, 02G05, 01B09

характеризуются по меньшей мере десятикратным увеличением активности TDCC, а также показывают увеличение аффинности по сравнению с молекулой с исходными CDR, 253BH10.

Нацеленная на GFP триспецифическая молекула, включенная в эти анализы в качестве отрицательного контроля, не показывала обнаруживаемого связывания ВСМА и не влияла на жизнеспособность клеток в анализе TDCC (данные не показаны).

#### Пример 2.

Способы оценки связывания и цитотоксической активности иллюстративных очищенных триспецифических антигенсвязывающих белков, содержащих связывающий ВСМА домен в соответствии с настоящим раскрытием, в отношении клеток Jeko1, MOLP8 и OPM2.

#### Получение белков.

Последовательности нацеленных на ВСМА триспецифических молекул, содержащих связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, которым предшествует лидерная последовательность и затем следует 6-гистидиновая метка (SEQ ID NO: 471), экспрессировали с использованием векторов и способов, описанных ранее. (Running Deer and Allison, 2004. Biotechnol Prog. 20:880-9), за исключением

реагентов на основе липидов и нелинейной плазмидной ДНК, которые использовали для трансфекции клеток. Рекombинантные триспецифические белки очищали с использованием аффинной хроматографии, ионообменной и/или эксклюзионной хроматографии. Очищенный белок определяли количественно с использованием теоретических коэффициентов экстинкции и абсорбционной спектроскопии. Изображение окрашенного Кумасси SDS-PAGE демонстрирует чистоту белков (фиг. 2).

Анализ цитотоксичности.

Анализ Т-клеточной цитотоксичности (TDCC) человека использовали для измерения способности рекрутеров Т-клеток, включая в себя триспецифические молекулы, направлять Т-клетки на уничтожение опухолевых клеток (Nazarian et al., 2015. J. Biomol. Screen., 20:519-27). В этом анализе Т-клетки и целевые клетки клеточной линии рака смешивали вместе в соотношении 10:1 в 384-луночном планшете и добавляли различные количества исследуемых триспецифических белков. Линии опухолевых клеток сконструировали для экспрессии белка люциферазы. Через 48 ч для количественного определения оставшихся жизнеспособных опухолевых клеток использовали люминесцентный анализ STEADY-GLO® (Promega).

В настоящем исследовании титры очищенного белка добавляли в анализы TDCC (анализы Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности), чтобы оценить, способно ли однодоменное антитело к ВСМА образовывать синапс между Т-клетками и ВСМА-экспрессирующими раковыми клеточными линиями Jeko1, MOLP8 и OPM2. Jeko1 представляет собой клеточную линию В-клеточной лимфомы. MOLP-8 представляет собой клеточную линию миеломы. ОГГМ-2 представляет собой клеточную линию миеломы человека.

Жизнеспособность клеток измеряли через 48 ч. Было видно, что триспецифические белки опосредуют Т-клеточное уничтожение. На фиг. 3 показан пример анализа жизнеспособности клеток с исследуемыми белками по сравнению с отрицательным контролем.  $EC_{50}$  для активности TDCC некоторых других исследуемых триспецифических белков перечислены ниже в табл. 2. Нацеленная на GFP триспецифическая молекула, включенная в эти анализы в качестве отрицательного контроля, не оказала влияния на жизнеспособность клеток (данные не показаны).

Таблица 2  
Значения  $EC_{50}$  TDCC для 3 клеточных линий для выбранных связывающих последовательностей в формате TriTAC

| Название конструктора | $EC_{50}$ Jeko1 (M) | $EC_{50}$ MOLP-8 (M) | $EC_{50}$ OPM-2 (M) |
|-----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| BH2T TriTAC           | 3,2E-10             | 2,0E-10              | 1,6E-10             |
| 01F07 TriTAC          | 5,3E-12             | 1,5E-12              | 4,4E-12             |
| 01F07-M34Y TriTAC     | 5,6E-12             | 1,5E-12              | 3,6E-12             |
| 01F07-M34G TriTAC     | 9,0E-12             | 2,2E-12              | 5,6E-12             |
| 01G08 TriTAC          | 1,5E-11             | 2,5E-12              | 6,9E-12             |
| 01H08 TriTAC          | 4,0E-12             | 9,4E-13              | 3,1E-12             |
| 02B05 TriTAC          | 8,3E-12             | 2,5E-12              | 6,5E-12             |
| 02B06 TriTAC          | 1,1E-11             | 2,8E-12              | 9,7E-12             |
| 02E05 TriTAC          | 1,1E-11             | 3,3E-12              | 1,2E-11             |
| 02E06 TriTAC          | 9,1E-12             | 2,4E-12              | 7,4E-12             |
| 02F02 TriTAC          | 8,2E-12             | 3,5E-12              | 1,0E-11             |
| 02F04 TriTAC          | 1,0E-11             | 2,5E-12              | 7,3E-12             |
| 02G02 TriTAC          | 1,1E-11             | 2,8E-12              | 6,6E-12             |
| 02G02-M34Y TriTAC     | 1,1E-11             | 5,6E-12              | 6,2E-12             |
| 02G02-M34G TriTAC     | 1,2E-11             | 4,0E-12              | 7,1E-12             |

Аффинность связывания.

В настоящем исследовании определяли аффинность связывания с белком ВСМА человека нацеленных на ВСМА триспецифических белков, содержащих связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию.

Таблица 3

Аффинность связывания очищенных нацеливающих триспецифических белков, содержащих связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию

| Название конструкта | KD ВСМА человека<br>(M) |
|---------------------|-------------------------|
| 01F07-M34Y TriTAC   | 3,0E-09                 |
| 01F07-M34G TriTAC   | 6,0E-09                 |
| 02B05 TriTAC        | 6,0E-09                 |
| 02G02-M34Y TriTAC   | 5,0E-09                 |
| 02G02-M34G TriTAC   | 7,0E-09                 |

#### Пример 3.

ADCC-активность иллюстративного мультидоменного антитела к ВСМА согласно настоящему раскрытию.

Настоящее исследование направлено на определение способности иллюстративного мультидоменного антитела к ВСМА согласно настоящему раскрытию опосредовать ADCC по сравнению с исходным антителом к ВСМА ламы, которое не содержит модификаций или замен последовательности, в качестве иллюстративного антитела согласно настоящему раскрытию. Оба антитела экспрессируются в виде мультидоменных белков, которые включают в себя дополнительный Fc-домен иммуноглобулина.

#### Материалы.

Доноров подвергают лейкофореze, и Cell Purification Group выделяют NK-клетки из лейкопака с использованием системы отрицательного отбора Milten<sup>i</sup> AUTOMACS<sup>®</sup> Pro. NK-клетки выдерживают в течение ночи при 4°C на встряхивателе-качалке, затем промывают, подсчитывают и ресуспендируют при  $4 \times 10^6$  клеток/мл в полной среде RPMI для использования в анализе ADCC.

Мишени. Мишени - опухолевые клетки выбирают на основе экспрессии ВСМА. Мишени отмывают и подсчитывают.  $6 \times 10^6$  мишеней ресуспендируют в полной среде RPMI и метят в конечной концентрации 10 мкМ кальцеина (Sigma, № по кат. C1359-00UL кальцеин am 4 мм в безводном DMSO) в течение 40 мин при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Клетки дважды промывают в PBS, ресуспендируют в полной среде RPMI и инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 2 ч. После мечения клетки-мишени промывают, пересчитывают и ресуспендируют при  $0,2 \times 10^6$  клеток/мл в полной среде RPMI для использования в анализе ADCC.

#### Способы.

Анализ ADCC проводят в 96-луночном круглодонном планшете для культивирования тканей (Corning 3799). Получают титры исследуемых белков от 20 мкг/мл до 0,0002 мкг/мл путем переноса 10 мкл в 1000 мкл полной среды RPMI, содержащей 10% FCS (разведение 1:10). Добавляют меченые кальцеином мишени, 50 мкл, чтобы получить содержание, составляющее 10000 клеток. Клетки-мишени и различные концентрации мультидоменных белков, содержащих либо иллюстративное однодоменное антитело к ВСМА, либо антитело сравнения, инкубируют в течение 40 мин при 4°C, затем добавляют эффекторы, NK-клетки, 50 мкл, чтобы получить содержание, составляющее 100000 клеток (10:1 - соотношение E:T). Культуры инкубируют в течение 4 ч при 37°C, затем отбирают супернатанты и анализируют высвобождение кальцеина путем измерения флуоресценции при 485-535 нм на счетчике Wallac Victor II 1420 Multilable HTS. Значения 100% лизиса определяют путем лизиса шести лунок меченых мишеней с помощью детергента IGEPAL<sup>®</sup> 630 (3 мкл на лунку), а значения спонтанного лизиса определяют путем измерения флуоресценции в супернатантах от мишеней отдельно.

#### Статистический анализ.

Процент (%) специфического лизиса определяют как (флуоресценция образца)-(флуоресценция спонтанного лизиса)/(100% лизис-флуоресценция спонтанного лизиса). Спонтанный лизис определяют в лунках, содержащих только мишени, а 100%-ный лизис определяют в лунках, в которых мишени лизируют с помощью детергента IGEPAL CA 630. Необработанные данные вводят в электронную таблицу Excel со встроенными формулами для расчета % специфического лизиса и полученные значения переносят в графическую программу (GraphPad Prism), где данные преобразуются в график подгонки кривой. Последующие анализы (расчеты линейной регрессии) выполняют в GraphPad для получения значений EC<sub>50</sub>.

#### Пример 4.

Активность CDC иллюстративного однодоменного антитела к ВСМА согласно настоящему раскрытию.

Для оценки противоопухолевой активности иллюстративного однодоменного антитела к ВСМА согласно настоящему раскрытию, против раковых клеток, исследовали цитотоксическую активность на моделях клеток A431/H9 и NCI-H226 в присутствии сыворотки человека в качестве источника компонента. Иллюстративное однодоменное антитело к ВСМА экспрессируется как мультидоменный белок, содержащий домен Fc.

Мультидоменный белок, содержащий иллюстративное однодоменное антитело к ВСМА согласно

настоящему раскрытию, проявляет сильную активность CDC путем уничтожения линий раковых клеток, и не проявляет активности в отношении линии BCMA-отрицательных клеток.

#### Пример 5.

Ксенотрансплантатная модель опухоли.

Иллюстративный триспецифический белок, нацеленный на BCMA, содержащий иллюстративный связывающий BCMA белок согласно настоящему раскрытию, 02B05 (SEQ ID NO: 383), оценивали в ксенотрансплантатной модели.

В день 0 мышей NCG подкожно инокулировали клетками RPMI-8226, а также внутрибрюшинно имплантировали нормальные моноклеарные клетки периферической крови человека (PBMС). Лечение иллюстративным триспецифическим белком, нацеленным на BCMA, также начинали в день 0 (qd×10) (один раз в день в течение 10 дней). Доза введения составляла 5 мкг/кг, 50 мкг/кг или 500 мкг/кг нацеленного на BCMA триспецифического белка 02B05, или носителя в качестве контроля. Объемы опухолей определяли в течение 25 дней. Как показано на фиг. 29, средние объемы опухолей были значительно ниже у мышей, получавших нацеленный на BCMA триспецифический белок (02B05) (в дозе 50 мкг/кг или 500 мкг/кг), по сравнению с мышами, получавшими носитель или более низкую дозу нацеленного на BCMA триспецифического белка (02B05) (при 5 мкг/кг).

В день 0 мышей NCG подкожно инокулировали клетками Jeko 1, а также внутрибрюшинно имплантировали нормальные моноклеарные клетки периферической крови человека (PBMС). Лечение иллюстративным триспецифическим белком, нацеленным на BCMA, начинали на 3-й день (qd×10) (один раз в день в течение 10 дней).

Доза введения составляла 5 мкг/кг, 50 мкг/кг или 500 мкг/кг нацеленного на BCMA триспецифического белка 02B05, или носителя в качестве контроля. Объемы опухолей определяли в течение 25 дней. Как показано на фиг. 30, средние объемы опухолей были значительно ниже у мышей, получавших нацеленный на BCMA триспецифический белок (02B05) (при 500 мкг/кг), по сравнению с мышами, получавшими носитель или более низкие дозы нацеленного на BCMA триспецифического белка (02B05) (в дозе 5 мкг/кг или 50 мкг/кг).

#### Пример 6.

Измерения аффинности в отношении BCMA, CD3ε и альбумина человека и яванского макака с использованием иллюстративного нацеленного на BCMA триспецифического белка, содержащего связывающий BCMA белок согласно настоящему раскрытию.

Цель этого исследования состояла в том, чтобы оценить аффинность иллюстративного триспецифического белка, нацеленного на BCMA, содержащего связывающий BCMA белок согласно настоящему раскрытию (02B05) (SEQ ID NO: 383), к BCMA человека, BCMA яванского макака, CD3ε человека, CD3ε яванского макака, человеческому альбумину, альбумину яванского макака и мышинному альбумину. Аффинности измеряли с помощью прибора Octet. Для этих измерений в стрептавидиновые наконечники сначала загружали 2,5 нМ BCMA-Fc человека, 2,5 нМ BCMA-Fc яванского макака, 2,5 нМ CD3ε-Fc человека, 2,5 нМ CD3ε-Fc яванского макака, 50 нМ сывороточного альбумина человека (HSA), 50 нМ сывороточного альбумина яванского макака или 50 нМ мышинного сывороточного альбумина. Впоследствии иллюстративный нацеленный на BCMA триспецифический белок, содержащий связывающий BCMA белок согласно настоящему раскрытию 02B05, инкубировали с наконечниками и после периода ассоциации наконечники перемещали в буферный раствор, чтобы позволить иллюстративному нацеленному на BCMA триспецифическому белку, содержащему связывающий BCMA белок согласно настоящему раскрытию (02B05) диссоциировать. Аффинности связывания с BCMA и CD3ε человека и яванского макака измеряли в присутствии 15 мг/мл сывороточного альбумина человека. Средние рассчитанные значения  $K_D$  из этих исследований представлены в табл. 4 (n обозначает количество независимых измерений, n/d указывает, что связывание не обнаружено в исследуемых условиях). Связывание было обнаружено с BCMA человека, CD3ε человека, CD3ε яванского макака, сывороточным альбумином человека, сывороточным альбумином яванского макака и сывороточным альбумином мыши. В исследуемых условиях не было обнаружено связывания с BCMA яванского макака.

Таблица 4

Измеренные значения  $K_D$  для иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, 02B05, с лигандами белка

| Лиганд белка | Вид               | $K_D$ (нМ)    | n |
|--------------|-------------------|---------------|---|
| ВСМА         | человек           | $2,4 \pm 0,2$ | 2 |
|              | яванский<br>макак | n/d           | 2 |
| CD3ε         | человек           | $8 \pm 1$     | 2 |
|              | яванский<br>макак | $7,8 \pm 0,4$ | 2 |
| Альбумин     | человек           | $6 \pm 1$     | 3 |
|              | яванский<br>макак | 7,5           | 1 |
|              | мышь              | 76            | 1 |

#### Пример 7.

Способность связываться с Т-клетками человека иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию.

Иллюстративный нацеленный на ВСМА триспецифический белок, содержащий связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, 02B05 (SEQ ID NO: 383), испытывали в отношении его способности связываться с очищенными Т-клетками. Вкратце, триспецифический белок ВСМА или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) инкубировали с очищенными Т-клетками от 4 различных анонимных доноров-людей. После отмывки несвязанного белка Т-клетки инкубировали с конъюгированным с Alexa Fluor 647 антителом, которое распознает антиальбуминовый домен в триспецифическом антигенсвязывающем нацеленном на ВСМА белке 02B05. Затем Т-клетки анализировали проточной цитометрией. Наблюдалось, что Т-клетки человека, инкубированные с триспецифическим антигенсвязывающим белком 02B05 ВСМА, характеризовались заметными сдвигами, связанными с окрашиванием Alexa Fluor 647, по сравнению с клетками, которые инкубировали с PBS. Результаты показаны на фиг. 4А, 4В, 4С и 4D. В заключение, это исследование показало, что иллюстративный триспецифический нацеленный на ВСМА белок, содержащий связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, способен связывать Т-клетки человека.

#### Пример 8.

Способность иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка согласно настоящему раскрытию связываться с экспрессирующими ВСМА клетками.

Иллюстративный нацеленный на ВСМА триспецифический белок, содержащий связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию 02B05 (SEQ ID NO: 383), испытывали в отношении его способности связываться с клетками, экспрессирующими ВСМА. Вкратце, триспецифический антигенсвязывающий нацеленный на ВСМА белок 02B05 инкубировали с клеточными линиями, экспрессирующими ВСМА (NCI-H929; EJM; RPMI-8226; OPM2) или лишенными ВСМА (NCI-H510A; DMS-153). Экспрессию РНК ВСМА в этих клетках указывают в значениях FPKM (количество фрагментов на миллион т.п.н.), приведенных на фиг. 5А-Е: значения РНК FPKM взяты из энциклопедии линии раковых клеток Клеточная линия Encyclopedia (Broad Institute, Cambridge, MA USA). После отмывки несвязанного белка клетки затем инкубировали с конъюгированным с Alexa Fluor 647 антителом, которое распознает антиальбуминовый домен в триспецифическом антигенсвязывающем нацеленном на ВСМА белке 02B05. Затем клетки анализировали проточной цитометрией. В качестве отрицательного контроля клетки инкубировали с триспецифическим белком, нацеленным на GFP. Клетки, экспрессирующие РНК ВСМА и инкубированные с триспецифическим белком ВСМА, характеризовались заметными сдвигами, связанными с окрашиванием Alexa Fluor 647, по сравнению с клетками, которые инкубировали с триспецифическим белком, нацеленным на GFP (как на фиг. 5А, 5В, 5D и 5Е). При этом клетки, лишенные РНК ВСМА, продуцировали эквивалентное окрашивание Alexa Fluor 647 с триспецифическим белком, нацеленным на ВСМА, и триспецифическим белком, нацеленным на GFP (как видно на фиг. 5С и 5F). Таким образом, это исследование показало, что иллюстративный триспецифический антигенсвязывающий, нацеленный на ВСМА белок был способен избирательно связываться с клетками, экспрессирующими ВСМА.



## Пример 9.

Способность иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, опосредовать Т-клеточное уничтожение раковых клеток, экспрессирующих ВСМА.

Иллюстративный ВСМА триспецифический белок, содержащий связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, 02B05 (SEQ ID NO: 383) испытывали в отношении его способности направлять Т-клетки на уничтожение клеток, экспрессирующих ВСМА, в присутствии и при отсутствии сывороточного альбумина человека (HSA) с использованием стандартного анализа TDCC, как описано в примере 1. Поскольку иллюстративный триспецифический белок ВСМА содержит антиальбуминовый домен, этот эксперимент выполняли для подтверждения того, что связывание с альбумином не мешает триспецифическому антигенсвязывающему белку, нацеленному на ВСМА, направлять Т-клетки на уничтожение экспрессирующих ВСМА клеток. Испытывали пять клеточных линий, экспрессирующих ВСМА: EJM, Jeko, OPM2, MOLP8 и NCI-H929. Репрезентативные данные для эксперимента с клетками EJM показаны на фиг. 6. Наблюдалось, что жизнеспособность клеток EJM снижалась с увеличением количества иллюстративного триспецифического антигенсвязывающего белка, нацеленного на ВСМА, 02B05 в присутствии или при отсутствии человеческого сывороточного альбумина (HSA), тогда как контрольный нацеленный на GFP триспецифический белок не влиял на жизнеспособность клеток. В присутствии альбумина необходимы более высокие концентрации нацеленного на ВСМА триспецифического белка для снижения жизнеспособности клеток EJM. Значения  $EC_{50}$  для уничтожения клеток триспецифическим белком, нацеленным на ВСМА, для клеток EJM, а также для клеток Jeko, OPM2, MOL8 и NCI-H929 при отсутствии или в присутствии HSA представлены в табл. 5. Для всех пяти клеточных линий иллюстративный триспецифический антигенсвязывающий нацеленный на ВСМА белок 02B05 направлял Т-клетки на уничтожение целевых клеток в присутствии HSA.

Таблица 5

Значения  $EC_{50}$  TDCC для иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, в присутствии или при отсутствии сывороточного альбумина человека с пятью различными экспрессирующими ВСМА клеточными линиями

| Клеточная линия | $EC_{50}$ без HSA (нМ) | $EC_{50}$ с HSA (нМ) |
|-----------------|------------------------|----------------------|
| <b>EJM</b>      | 1,0                    | 53                   |
| <b>Jeko</b>     | 8,3                    | 662                  |
| <b>OPM2</b>     | 6,5                    | 328                  |
| <b>MOLP8</b>    | 2,5                    | 388                  |
| <b>NCI-H929</b> | 6,7                    | 194                  |

## Пример 10.

Способность иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, опосредовать Т-клеточное уничтожение раковых клеток, экспрессирующих ВСМА, с использованием меньшего соотношения целевых клеток к эффекторным клеткам.

В стандартном анализе TDCC (как описано в примере 1), отношение 1 целевая клетка (клетки EJM или клетки OPM2) на 10 эффекторных клеток (Т-клеток) используют в 48-часовом анализе. В этом эксперименте проверяли способность иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего иллюстративный связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, 02B05 (SEQ ID NO: 383) направлять Т-клетки на уничтожение целевых клеток с меньшими соотношениями целевых клеток к эффекторным клеткам. Ожидалось, что при использовании меньшего количества эффекторных клеток будет наблюдаться меньшее уничтожение. Испытывали две клеточные линии, экспрессирующие ВСМА, EJM и OPM2, с использованием соотношения целевых клеток к эффекторам, составляющие 1:1, 1:3 и 1:10, и эксперимент проводили в присутствии HSA 15 мг/мл. Триспецифический белок, нацеленный на GFP, использовали в качестве отрицательного контроля. Данные этого эксперимента показаны на фиг. 7 (анализ TDCC с клетками EJM) и на фиг. 8 (анализ TDCC с клетками OPM2). Как и ожидалось, почти полное уничтожение целевых клеток наблюдали с соотношением целевых клеток к эффекторным клеткам, составляющим 1:10. Степень уничтожения уменьшалась с уменьшением эффекторных клеток. Значения  $EC_{50}$  для уничтожения клеток с каждым соотношением перечислены в табл. 6 (n/d указывает, что для расчета значения  $EC_{50}$  наблюдалось недостаточное уничтожение). Значения  $EC_{50}$  увеличивались, когда присутствовало меньше эффекторных клеток. Таким образом, как и ожидалось, уменьшение количества эффекторных клеток к целевым клеткам снижало активность TDCC триспецифического белка, нацеленного на ВСМА.

Таблица 6

Значения  $EC_{50}$  TDCC для иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05), с различным соотношением целевых клеток (клеток EJM) к эффекторным клеткам (Т-клеткам)

(исследовано в присутствии HSA 15 мг/мл)

| Соотношение    |                           | EC <sub>50</sub> OPM2 |
|----------------|---------------------------|-----------------------|
| целевых клеток |                           |                       |
| к Т-клеткам    | EC <sub>50</sub> EJM (nM) | (nM)                  |
| 1:10           | 154                       | 371                   |
| 1:3            | 523                       | 1896                  |
| 1:1            | 1147                      | n/d                   |

Пример 11.

Способность иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, опосредовать Т-клеточное уничтожение раковых клеток, экспрессирующих ВСМА, в зависимости от времени, с использованием меньшего соотношения целевых клеток к эффекторным клеткам.

В стандартном анализе TDCC (пример 1), отношение 1 целевая клетка на 10 эффекторных клеток (Т-клеток) используют в 48-часовом анализе. В этом эксперименте проводили определение зависимости от времени с использованием 1:1 соотношения целевых клеток (EJM-клеток) к эффекторным клеткам (Т-клеткам). Ожидалось, что с увеличением времени соотношение 1 к 1 приведет к уничтожению целевых клеток. Анализ TDCC проводили с использованием EJM и соотношения целевых клеток к эффекторным клеткам, составляющего 1:1, и эксперимент проводили в присутствии 15 мг/мл HSA. Триспецифический белок, нацеленный на GFP, использовали в качестве отрицательного контроля. Жизнеспособность целевых клеток измеряли в дни 1, 2, 3 и 4 после инкубации целевых клеток и эффекторных клеток в соотношении 1:1 в присутствии иллюстративного триспецифического антигенсвязывающего нацеленного на ВСМА белка 02B05 и 15 мг/мл HSA, или нацеленного на GFP триспецифического белка и 15 мг/мл HSA. Хотя в 1-й день не наблюдалось уничтожения целевых клеток, уничтожение наблюдалось во всех других временных точках с помощью триспецифического антигенсвязывающего нацеленного на ВСМА белка 02B05, причем количество уничтожения увеличивалось со временем (фиг. 9). Никакого уничтожения целевых клеток не наблюдалось при использовании триспецифического белка, нацеленного на GFP. Значения  $EC_{50}$ , рассчитанные для уничтожения клеток в каждый день, представлены в табл. 7 (n/d указывает на количество уничтожения, недостаточное для определения значения  $EC_{50}$ ). Из этого исследования сделали вывод, что иллюстративный триспецифический нацеленный на ВСМА белок 02B05 был способен направлять уничтожение Т-клеток при меньшем количестве эффекторных клеток, но для достижения более полного уничтожения требовалось больше времени.

Таблица 7

Значения  $EC_{50}$  TDCC для иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05) с соотношениями 1:1 целевых клеток (клеток EJM) к эффекторным клеткам (Т-клеткам) (испытывали в присутствии 15 мг/мл HSA) в различные моменты времени

|        | <b><math>EC_{50}</math> (нМ)</b> |
|--------|----------------------------------|
| День 1 | n/d                              |
| День 2 | 1859                             |
| День 3 | 1420                             |
| День 4 | 1012                             |

Пример 12.

Способность иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, направлять Т-клетки человека на уничтожение экспрессирующих ВСМА клеток.

Иллюстративный ВСМА триспецифический белок, содержащий связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, 02B05 (SEQ ID NO: 383), испытывали в отношении его способности направлять Т-клетки от четырех различных анонимных доноров-людей на уничтожение четырех различных экспрессирующих ВСМА клеток в присутствии 15 мг/мл сывороточного альбумина человека (HSA) с использованием стандартного анализа TDCC, как описано в примере 1. Экспрессирующие ВСМА клеточные линии представляли собой EJM, NCI-H929, OPM2 и RPMI8226. В качестве отрицательных контролей две клеточные линии, в которых отсутствует экспрессия ВСМА, OVCAR8 и NCI-H510A, также испытывали в анализах TDCC. Контрольный нацеленный на GFP триспецифический белок также использовали в качестве отрицательного контроля. При использовании четырех клеточных линий, экспрессирующих ВСМА, и всех четырех доноров Т-клеток жизнеспособность клеток снижалась с увеличением

количества триспецифического белка, нацеленного на ВСМА, но не с увеличением триспецифического белка, нацеленного на GFP (фиг. 10, 11, 12 и 13). Значения  $EC_{50}$  для уничтожения клеток приведены в табл. 8. Иллюстративный триспецифический антигенсвязывающий нацеленный на ВСМА белок 02B05 не направлял на уничтожение клеточные линии, в которых отсутствует экспрессия ВСМА (фиг. 14 и 15). Таким образом, сделали заключение, что иллюстративный триспецифический антигенсвязывающий нацеленный на ВСМА белок 02B05 был способен направлять Т-клетки от нескольких доноров для уничтожения спектра клеточных линий, экспрессирующих ВСМА.

Таблица 8

Значения  $EC_{50}$  иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка из анализов TDCC для четырех экспрессирующих ВСМА клеточных линий и четырех доноров Т-клеток в присутствии 15 мг/мл HSA

|          | $EC_{50}$ (nM) |      |          |     |
|----------|----------------|------|----------|-----|
|          | H929           | OPM2 | RPMI8226 | EJM |
| Донор 02 | 169            | 250  | 275      | 151 |
| Донор 35 | 113            | 199  | 371      | 121 |
| Донор 81 | 124            | 265  | 211      | 143 |
| Донор 86 | 239            | 416  | 543      | 191 |

#### Пример 13.

Способность иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, направлять Т-клетки яванского макака на уничтожение экспрессирующих ВСМА клеток.

Иллюстративный нацеленный на ВСМА триспецифический белок, содержащий связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию 02B05 (SEQ ID NO: 383) испытывали в отношении его способности направлять Т-клетки от яванских макаков на уничтожение экспрессирующих ВСМА клеток в присутствии 15 мг/мл сывороточного альбумина человека (HSA). Условия эксперимента являлись такими же, как описано в примере 1, за исключением того, что мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) от яванских макаков использовали в качестве источника Т-клеток. Исследовали две экспрессирующие ВСМА клеточные линии, RPMI8226 и NCI-H929. Как показано на фиг. 16 и 17, нацеленный на ВСМА триспецифический белок был способен направлять Т-клетки, присутствующие в РВМС яванского макака, на уничтожение двух экспрессирующих ВСМА клеточных линий. Значения  $EC_{50}$  для уничтожения клеток представлены в табл. 9. Нацеленный на GFP триспецифический белок не оказывал влияние на жизнеспособность экспрессирующих ВСМА клеток. Таким образом, нацеленный на ВСМА триспецифический белок, который может связывать CD3ε яванского макака (как показано в примере 6), может направлять Т-клетки яванского макака на уничтожение клеток, экспрессирующих ВСМА человека.

Таблица 9

Значения  $EC_{50}$  триспецифического нацеленного на ВСМА белка из анализов TDCC с двумя клеточными линиями и двумя донорами РМВС -яванскими макаками в присутствии 15 мг/мл HSA

|            | $EC_{50}$ (nM) |          |
|------------|----------------|----------|
|            | RPMI8226       | NCI-H929 |
| Донор G322 | 3654           | 1258     |
| Донор GA33 | 1003           | 288      |

#### Пример 14.

Иллюстративный нацеленный на ВСМА триспецифический белок, содержащий связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, в опосредовании индукции активации Т-клеток.

Иллюстративный нацеленный на ВСМА триспецифический белок, содержащий связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, 02B05 (SEQ ID NO: 383) испытывали в отношении его способности активировать Т-клетки в присутствии экспрессирующих ВСМА клеток. Экспрессирующие ВСМА клеточные линии представляли собой EJМ, OPM2 и RPMI8226. В качестве отрицательных контролей также включали две клеточные линии, в которых отсутствовала экспрессия ВСМА, OVCAR8 и NCI-H510A. Т-клетки получали от четырех различных анонимных доноров-людей. Анализы проводили с использованием условий стандартного анализа TDCC, как описано в примере 1, за исключением того, что анализ адаптировали для 96-луночного формата и анализ проводили в присутствии 15 мг/мл HSA. Через 48 ч анализа активацию Т-клеток оценивали с использованием проточной цитометрии для измерения экспрессии биомаркеров CD25 и CD69 Т-клеточной активации на поверхности Т-клеток. С увеличением концентраций иллюстративного триспецифического антигенсвязывающего нацеленного на ВСМА белка 02B05 увеличенная экспрессия CD69 и CD25 наблюдалась на Т-клетках, когда их совместно культивировали с экспрессирующими ВСМА клетками (как показано на фиг. 18-23). Таким образом, наблю-

даемое взаимодействие зависело от взаимодействия связывающей ВСМА последовательности в пределах иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, так как практически не наблюдалось активации с контрольным триспецифическим белком, нацеленным на GFP (как показано на фиг. 18-23) или с целевыми клетками без выраженной экспрессии ВСМА (как показано на фиг. 24-27). Таким образом, иллюстративный нацеленный на ВСМА триспецифический белок активировал Т-клетки в совместных культурах, содержащих клетки, экспрессирующие ВСМА. Этот вывод подкрепляется дополнительными данными. Например, экспрессию цитокина,  $TNF\alpha$ , измеряли в среде, собранной из совместного культивирования Т-клеток и целевых клеток, экспрессирующих ВСМА, обработанных увеличивающимися концентрациями иллюстративного триспецифического белка, нацеленного на ВСМА, или отрицательным контролем - триспецифическим белком, нацеленным на GFP. Совместное культивирование выполняли с использованием условий стандартного анализа TDCC (как описано в примере 1) с добавлением 15 мг/мл HSA.  $TNF\alpha$  измеряли с использованием электрохемилюминесцентного анализа (Meso Scale Discovery). Устойчивую индукцию экспрессии  $TNF\alpha$  наблюдали с иллюстративным триспецифическим белком, нацеленным на ВСМА, содержащим связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, 02B05 (SEQ ID NO: 383), но не с триспецифическим белком, нацеленным на GFP (фиг. 28). Этот результат дополнительно подтверждает, что иллюстративный нацеленный на ВСМА триспецифический белок активировал Т-клетки в совместных культурах, содержащих экспрессирующие ВСМА клетки.

#### Пример 15.

Фармакокинетика иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию.

Яванским макакам вводили однократные внутривенные дозы иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка, содержащего связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (02B05) (SEQ ID NO: 383), в дозах, составляющих 0,01 мг/кг, 0,1 мг/кг или 1 мг/кг. В каждую группу дозирования включали двух животных. После введения образцы сыворотки собирали и анализировали с помощью двух различных электрохемилюминесцентных анализов. В одном анализе в качестве реагента для захвата использовали биотинилированный CD3ε и его обнаруживали с помощью меченного сульфогруппой ВСМА (называемого функциональным анализом). В другом анализе использовали в качестве реагента для захвата биотинилированное антитело, распознающее антиальбуминовый домен, в иллюстративном нацеленном на ВСМА триспецифическом белке, содержащем связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, 02B05 (SEQ ID NO: 383), и в качестве реагента для обнаружения использовали антитело, меченное сульфогруппой, распознающее анти-CD3-связывающий домен в иллюстративном нацеленном на ВСМА триспецифическом белке, содержащем связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию (т.е. антиидиотипическое антитело). Результаты электрохемилюминесцентных анализов представлены на фиг. 31. Как видно на фиг. 31, иллюстративный нацеленный на ВСМА триспецифический белок обнаруживали в образцах сыворотки яванского макака даже через 504 ч после введения. Иллюстративный триспецифический белок, нацеленный на ВСМА, идентифицировали с использованием как меченного сульфогруппой ВСМА (линии, помеченные термином "функциональный" на фиг. 31), так и антиидиотипическим антителом (линии, помеченные термином "антиидиотипический" на фиг. 31).

Чтобы подтвердить, что иллюстративный триспецифический белок, нацеленный на ВСМА, сохранял способность направлять Т-клетки для уничтожения экспрессирующих ВСМА клеток EJM, после *in vivo* введения образцы сыворотки с момента времени 168 ч испытывали в анализе TDCC (как описано в примере 1) в присутствии 16,7% сыворотки от яванского макака, которая не подвергалась воздействию триспецифического белка, нацеленного на ВСМА, определяя титр иллюстративного нацеленного на ВСМА триспецифического белка с использованием концентраций белка, определенных с помощью электрохемилюминесцентных анализов (показано на рис. 32). Свежеразбавленный иллюстративный нацеленный на ВСМА триспецифический белок, содержащий связывающий ВСМА белок согласно настоящему раскрытию, 02B05 (SEQ ID NO: 383), сравнивали с триспецифическим белком, нацеленным на ВСМА, собранным у испытуемых яванских макак через 168 ч. Триспецифический белок, нацеленный на GFP, включали в качестве отрицательного контроля. Это исследование продемонстрировало, что иллюстративный нацеленный на ВСМА триспецифический белок, собранный из сыворотки исследуемых яванских макак, обладал такой же активностью, что и свежеразбавленный белок, и что белок в образцах сыворотки сохранял способность направлять Т-клетки для уничтожения экспрессирующих ВСМА клеток EJM.

Хотя в настоящем документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в настоящей области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Специалистам в настоящей области техники будут очевидны многочисленные вариации, изменения и замены без отступления от настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем документе, можно использовать при практическом применении настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения и что таким образом будут охватываться способы и структуры в пределах объема этой фор-

мулы изобретения и ее эквивалентов.

Таблица последовательностей

| SEQ ID NO:        | Описание                       | Последовательность                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.                | <b>Иллюстративная<br/>CDR1</b> | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> PX <sub>8</sub> G, где X <sub>1</sub> представляет собой T или S; X <sub>2</sub> представляет собой N, D или S; X <sub>3</sub> представляет собой I, D, Q, H, V или E; X <sub>4</sub> представляет собой F, S, E, A, T, M, V, I, D, Q, P, R или G; X <sub>5</sub> представляет собой S, M, R или N; X <sub>6</sub> представляет собой I, K, S, T, R, E, D, N, V, H, L, A, Q или G; X <sub>7</sub> |
|                   |                                | представляет собой S, T, Y, R или N; и X <sub>8</sub> представляет собой M, G или Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 2.                | <b>Иллюстративная<br/>CDR2</b> | AI X <sub>9</sub> GX <sub>10</sub> X <sub>11</sub> TX <sub>12</sub> YADSVK, где X <sub>9</sub> представляет собой H, N или S; X <sub>10</sub> представляет собой F, G, K, R, P, D, Q, H, E, N, T, S, A, I, L или V; X <sub>11</sub> представляет собой S, Q, E, T, K или D; и X <sub>12</sub> представляет собой L, V, I, F, Y или W                                                                                                                                                                       |
| 3.                | <b>Иллюстративная<br/>CDR3</b> | VPWGX <sub>13</sub> YHPX <sub>14</sub> X <sub>15</sub> VX <sub>16</sub> , где X <sub>13</sub> представляет собой D, I, T, K, R, A, E, S или Y; X <sub>14</sub> представляет собой R, G, L, K, T, Q, S или N; X <sub>15</sub> представляет собой N, K, E, V, R, M или D; и X <sub>16</sub> представляет собой Y, A, V, K, H, L, M, T, R, Q, C, S или N                                                                                                                                                      |
| <b>SEQ ID NO:</b> | <b>Название</b>                | <b>HCDR1</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 4.                | 01A01                          | TDIFSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 5.                | 01A02                          | TNIFSSSPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 6.                | 01A03                          | TNIFSISPGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 7.                | 01A04                          | TNIFMISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 8.                | 01A05                          | TNIFSSSPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 9.                | 01A06                          | TNIFSIRPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 10.               | 01A07                          | TNISSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 11.               | 01A08                          | TNIFSSSPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 12.               | 01A09                          | TNIFSITPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 13.               | 01B01                          | TNIPSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 14.               | 01B02                          | TNITSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 15.               | 01B03                          | TNIFSKSPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 16.               | 01B04                          | TNDFSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 17.               | 01B05                          | TNITSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 18.               | 01B06                          | TNIFSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 19.               | 01B07                          | TNIFSRSPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 20.               | 01B08                          | TNIESISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 21.               | 01B09                          | SNIFSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 22.               | 01B12                          | TNIFSTSPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 23.               | 01C01                          | TNIVSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 24.               | 01C02                          | TNIESISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 25.               | 01C04                          | TNIPSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 26.               | 01C05                          | TNIFSSSPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 27.               | 01C06                          | TNIFSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 28.               | 01C07                          | TNIFSITPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 29.               | 01C08                          | TNIFSNSPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 30.               | 01C10                          | TNISSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31.               | 01D02                          | TNIVSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 32.               | 01D03                          | TNIFSNSPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 33.               | 01D04                          | TNITSISPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 34.               | 01D05                          | TNIFSDSPMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

**043081**

|     |       |            |
|-----|-------|------------|
| 35. | 01D06 | TNIFSRSPMG |
| 36. | 01D07 | TNIFSASPMG |
| 37. | 01D10 | TNIFSASPMG |
| 38. | 01E03 | TNITSISPMG |
| 39. | 01E04 | TNIASISPMG |
| 40. | 01E05 | TNIFSRSPMG |
| 41. | 01E06 | TNIFSLSPMG |
| 42. | 01E07 | TNIPSISPMG |
| 43. | 01E08 | TNIFSQSPMG |
| 44. | 01E10 | TNIESISPMG |
| 45. | 01F02 | TNIFSHSPMG |
| 46. | 01F03 | TNIFSESPMG |
| 47. | 01F04 | TNIDSISPMG |
| 48. | 01F05 | TNIFSSSPMG |
| 49. | 01F07 | TNIFSTSPMG |
| 50. | 01F08 | TNITSVSPMG |
| 51. | 01F09 | TNISSISPMG |
| 52. | 01F10 | SNIFSISPMG |
| 53. | 01F12 | TNIFRISPMG |
| 54. | 01G01 | TNIVSISPMG |
| 55. | 01G04 | TNIDSISPMG |
| 56. | 01G06 | TNIFSRSPMG |
| 57. | 01G08 | TNIQSPMG   |
| 58. | 01G09 | TNIFNISPMG |
| 59. | 01G10 | TNEFSISPMG |
| 60. | 01G11 | TNIPSISPMG |
| 61. | 01H01 | TNIGSISPMG |
| 62. | 01H04 | TNIFSKSPMG |
| 63. | 01H05 | TNIFSITPMG |
| 64. | 01H06 | TSDFSISPMG |
| 65. | 01H08 | TNIMSISPMG |
| 66. | 01H09 | TNIMSISPMG |
| 67. | 01H10 | TNIPSISPMG |
| 68. | 01H11 | TNIFSTSPMG |
| 69. | 02A04 | TNIFSQSPMG |
| 70. | 02A05 | TNIASISPMG |
| 71. | 02A07 | TNIFSKSPMG |
| 72. | 02A08 | TNIFSRSPMG |
| 73. | 02A11 | TNHFSISPMG |
| 74. | 02B01 | TNIFSNSPMG |
| 75. | 02B04 | TNIFSTSPMG |

043081

|      |            |             |
|------|------------|-------------|
| 76.  | 02B05      | TNIFSISPYG  |
| 77.  | 02B06      | TNIFSNSPMG  |
| 78.  | 02B07      | TNIFSSSPMG  |
| 79.  | 02B11      | TNIVSISPMG  |
| 80.  | 02B12      | TNISSISPMG  |
| 81.  | 02C01      | TNIISISPMG  |
| 82.  | 02C03      | TNIASISPMG  |
| 83.  | 02C05      | TNIFSESPMG  |
| 84.  | 02C06      | TNIFSTSPMG  |
| 85.  | 02D06      | TNISSISPMG  |
| 86.  | 02D09      | TNVVISISPMG |
| 87.  | 02D11      | TNEFSISPMG  |
| 88.  | 02E03      | TNIFSNSPMG  |
| 89.  | 02E05      | TNIFSRSPMG  |
| 90.  | 02E06      | TNIFSDSPMG  |
| 91.  | 02E09      | TNDFSISPMG  |
| 92.  | 02F02      | TNIFSKSPMG  |
| 93.  | 02F03      | TNIFSIYPMG  |
| 94.  | 02F04      | TNIFSSSPMG  |
| 95.  | 02F05      | TNIFSVSPMG  |
| 96.  | 02F06      | TNIFSITPMG  |
| 97.  | 02F07      | TNIESISPMG  |
| 98.  | 02F11      | TNIFSTSPMG  |
| 99.  | 02F12      | TNIESISPMG  |
| 100. | 02G01      | TNIFSINPMG  |
| 101. | 02G02      | TNIFSITPMG  |
| 102. | 02G05      | TNITSISPMG  |
| 103. | 02G06      | TNIFSGSPMG  |
| 104. | 02G07      | TNIFSITPMG  |
| 105. | 02G08      | TNIDSISPMG  |
| 106. | 02G09      | TNIFSDSPMG  |
| 107. | 02G11      | TNIDSISPMG  |
| 108. | 02H01      | TNIFSKSPMG  |
| 109. | 02H04      | TNIFSVSPMG  |
| 110. | 02H05      | TNQFSISPMG  |
| 111. | 02H06      | TNIRSISPMG  |
| 112. | 02H09      | TNIFSRSPMG  |
| 113. | 02H11      | TNITSISPMG  |
| 114. | 01F07-M34Y | TNIFSTSPYG  |
| 115. | 01F01-M34G | TNIFSTSPGG  |
| 116. | 02G02-M34Y | TNIFSITPYG  |

|                   |                 |                |
|-------------------|-----------------|----------------|
| 117.              | 02G02-M34G      | TNIFSITPGG     |
| <b>SEQ ID NO:</b> | <b>Название</b> | <b>CDR2</b>    |
| 118.              | 01A01           | AIHGGSTLYADSVK |
| 119.              | 01A02           | AINGFSTLYADSVK |
| 120.              | 01A03           | AIHGSSTLYADSVK |
| 121.              | 01A04           | AIHGDSTLYADSVK |
| 122.              | 01A05           | AIHGFSTLYADSVK |
| 123.              | 01A06           | AIHGFSTVYADSVK |
| 124.              | 01A07           | AIHGTSTLYADSVK |
| 125.              | 01A08           | AIHGESTLYADSVK |
| 126.              | 01A09           | AIHGRSTLYADSVK |
| 127.              | 01B01           | AIHGESTLYADSVK |
| 128.              | 01B02           | AISGFSTLYADSVK |
| 129.              | 01B03           | AIHGKSTLYADSVK |
| 130.              | 01B04           | AIHGKSTLYADSVK |
| 131.              | 01B05           | AIHGFETLYADSVK |
| 132.              | 01B06           | AIHGDSTLYADSVK |
| 133.              | 01B07           | AIHGNSTLYADSVK |
| 134.              | 01B08           | AIHGSSTLYADSVK |
| 135.              | 01B09           | AIHGSSTLYADSVK |
| 136.              | 01B12           | AIHGFQTLYADSVK |
| 137.              | 01C01           | AIHGHSTLYADSVK |
| 138.              | 01C02           | AIHGNSTLYADSVK |
| 139.              | 01C04           | AIHGDSTLYADSVK |
| 140.              | 01C05           | AIHGFKTLYADSVK |
| 141.              | 01C06           | AIHGDSTLYADSVK |
| 142.              | 01C07           | AIHGFSTYYADSVK |
| 143.              | 01C08           | AIHGGSTLYADSVK |
| 144.              | 01C10           | AIHGFSTLYADSVK |
| 145.              | 01D02           | AIHGKSTLYADSVK |
| 146.              | 01D03           | AIHGDSTLYADSVK |
| 147.              | 01D04           | AIHGVSTLYADSVK |
| 148.              | 01D05           | AIHGTSTLYADSVK |
| 149.              | 01D06           | AIHGDSTLYADSVK |
| 150.              | 01D07           | AIHGSSTLYADSVK |
| 151.              | 01D10           | AIHGSSTLYADSVK |
| 152.              | 01E03           | AIHGDSTLYADSVK |
| 153.              | 01E04           | AIHGTSTLYADSVK |
| 154.              | 01E05           | AIHGTSTLYADSVK |
| 155.              | 01E06           | AIHGDSTLYADSVK |
| 156.              | 01E07           | AIHQSTLYADSVK  |



043081

|      |       |                |
|------|-------|----------------|
| 157. | 01E08 | AIHGDSTLYADSVK |
| 158. | 01E10 | AIHGKSTLYADSVK |
| 159. | 01F02 | AIHGTSTLYADSVK |
| 160. | 01F03 | AIHGNSTLYADSVK |
| 161. | 01F04 | AIHGFQTLYADSVK |
| 162. | 01F05 | AIHGFSTWYADSVK |
| 163. | 01F07 | AIHGFSTIYADSVK |
| 164. | 01F08 | AIHGPSTLYADSVK |
| 165. | 01F09 | AIHGHSTLYADSVK |
| 166. | 01F10 | AIHGESTLYADSVK |
| 167. | 01F12 | AIHGDSTLYADSVK |
| 168. | 01G01 | AIHGDSTLYADSVK |
| 169. | 01G04 | AIHGNSTLYADSVK |
| 170. | 01G06 | AIHGFETLYADSVK |
| 171. | 01G08 | AIHGFETLYADSVK |
| 172. | 01G09 | AIHGFSTYYADSVK |
| 173. | 01G10 | AIHGLSTLYADSVK |
| 174. | 01G11 | AIHGASTLYADSVK |
| 175. | 01H01 | AIHGQSTLYADSVK |
| 176. | 01H04 | AIHGQSTLYADSVK |
| 177. | 01H05 | AIHGTSTLYADSVK |
| 178. | 01H06 | AIHGFETLYADSVK |
| 179. | 01H08 | AIHGFSTVYADSVK |
| 180. | 01H09 | AIHGNSTLYADSVK |
| 181. | 01H10 | AIHGESTLYADSVK |
| 182. | 01H11 | AIHGFSTLYADSVK |
| 183. | 02A04 | AIHGKSTLYADSVK |
| 184. | 02A05 | AIHGKSTLYADSVK |
| 185. | 02A07 | AIHGNSTLYADSVK |
| 186. | 02A08 | AIHGESTLYADSVK |
| 187. | 02A11 | AIHGSSTLYADSVK |
| 188. | 02B01 | AIHGRSTLYADSVK |
| 189. | 02B04 | AIHGFSTIYADSVK |
| 190. | 02B05 | AIHGTSTLYADSVK |
| 191. | 02B06 | AIHGFSTLYADSVK |
| 192. | 02B07 | AIHGHSTLYADSVK |
| 193. | 02B11 | AIHGDSTLYADSVK |
| 194. | 02B12 | AIHGFDTLYADSVK |
| 195. | 02C01 | AIHGASTLYADSVK |
| 196. | 02C03 | AIHGSSTLYADSVK |
| 197. | 02C05 | AIHGFTTLYADSVK |

## 043081

|                   |                 |                |
|-------------------|-----------------|----------------|
| 198.              | 02C06           | AIHGTSTLYADSVK |
| 199.              | 02D06           | AIHGFSTVYADSVK |
| 200.              | 02D09           | AIHGKSTLYADSVK |
| 201.              | 02D11           | AIHGESTLYADSVK |
| 202.              | 02E03           | AIHGPSTLYADSVK |
| 203.              | 02E05           | AIHGSTLYADSVK  |
| 204.              | 02E06           | AIHGFSTFYADSVK |
| 205.              | 02E09           | AIHGGSTLYADSVK |
| 206.              | 02F02           | AIHGSSTLYADSVK |
| 207.              | 02F03           | AIHGSSTLYADSVK |
| 208.              | 02F04           | AIHGFSTLYADSVK |
| 209.              | 02F05           | AIHGNSTLYADSVK |
| 210.              | 02F06           | AIHGESTLYADSVK |
| 211.              | 02F07           | AIHGFSTLYADSVK |
| 212.              | 02F11           | AIHGTSTLYADSVK |
| 213.              | 02F12           | AIHGTSTLYADSVK |
| 214.              | 02G01           | AIHGFDLYADSVK  |
| 215.              | 02G02           | AIHGASTLYADSVK |
| 216.              | 02G05           | AIHGNSTLYADSVK |
| 217.              | 02G06           | AIHGNSTLYADSVK |
| 218.              | 02G07           | AIHGESTLYADSVK |
| 219.              | 02G08           | AIHGESTLYADSVK |
| 220.              | 02G09           | AIHGFSTLYADSVK |
| 221.              | 02G11           | AIHGSSTLYADSVK |
| 222.              | 02H01           | AIHGSSTLYADSVK |
| 223.              | 02H04           | AIHGNSTLYADSVK |
| 224.              | 02H05           | AIHGKSTLYADSVK |
| 225.              | 02H06           | AIHGSSTLYADSVK |
| 226.              | 02H09           | AIHGSSTLYADSVK |
| 227.              | 02H11           | AIHGESTLYADSVK |
| 228.              | 01F07-M34Y      | AIHGFSTIYADSVK |
| 229.              | 01F01-M34G      | AIHGFSTIYADSVK |
| 230.              | 02G02-M34Y      | AIHGASTLYADSVK |
| 231.              | 02G02-M34G      | AIHGASTLYADSVK |
| <b>SEQ ID NO:</b> | <b>Название</b> | <b>CDR3</b>    |
| 232.              | 01A01           | VPWGDYHPRNVA   |
| 233.              | 01A02           | VPWGDYHPRNVH   |
| 234.              | 01A03           | VPWGDYHPRNVY   |
| 235.              | 01A04           | VPWGRYHPRNVY   |
| 236.              | 01A05           | VPWGDYHPRNVY   |
| 237.              | 01A06           | VPWGDYHPRNVY   |

**043081**

|      |       |              |
|------|-------|--------------|
| 238. | 01A07 | VPWGDYHPGNVY |
| 239. | 01A08 | VPWGDYHPRKVY |
| 240. | 01A09 | VPWGSYHPRNVY |
| 241. | 01B01 | VPWGDYHPRNVA |
| 242. | 01B02 | VPWGDYHPRNVY |
| 243. | 01B03 | VPWGDYHPRNVV |
| 244. | 01B04 | VPWGDYHPRNVK |
| 245. | 01B05 | VPWGDYHPGNVY |
| 246. | 01B06 | VPWGEYHPRNVY |
| 247. | 01B07 | VPWGIYHPRNVY |
| 248. | 01B08 | VPWGRYHPRNVY |
| 249. | 01B09 | VPWGDYHPGNVY |
| 250. | 01B12 | VPWGDYHPRNVV |
| 251. | 01C01 | VPWGDYHPGNVY |
| 252. | 01C02 | VPWGRYHPRNVY |
| 253. | 01C04 | VPWGDYHPRNVY |
| 254. | 01C05 | VPWGDYHPGNVY |
| 255. | 01C06 | VPWGKYHPRNVY |
| 256. | 01C07 | VPWGSYHPRNVY |
| 257. | 01C08 | VPWGDYHPRNVH |
| 258. | 01C10 | VPWGYYHPRNVY |
| 259. | 01D02 | VPWGDYHPGNVY |
| 260. | 01D03 | VPWGDYHPRNVR |
| 261. | 01D04 | VPWGDYHPRNVQ |
| 262. | 01D05 | VPWGDYHPRNVY |
| 263. | 01D06 | VPWGDYHPRNVT |
| 264. | 01D07 | VPWGDYHPRNVN |
| 265. | 01D10 | VPWGRYHPRNVY |
| 266. | 01E03 | VPWGDYHPGNVY |
| 267. | 01E04 | VPWGDYHPGNVY |
| 268. | 01E05 | VPWGKYHPRNVY |
| 269. | 01E06 | VPWGDYHPRNVY |
| 270. | 01E07 | VPWGDYHPRNVQ |
| 271. | 01E08 | VPWGDYHPGNVC |
| 272. | 01E10 | VPWGDYHPRRVY |
| 273. | 01F02 | VPWGRYHPRNVY |
| 274. | 01F03 | VPWGTYHPRNVY |
| 275. | 01F04 | VPWGDYHPGNVY |
| 276. | 01F05 | VPWGRYHPRNVY |
| 277. | 01F07 | VPWGDYHPGNVY |
| 278. | 01F08 | VPWGDYHPTNVY |

043081

|      |       |              |
|------|-------|--------------|
| 279. | 01F09 | VPWGRYHPRNVY |
| 280. | 01F10 | VPWGDYHPRNVT |
| 281. | 01F12 | VPWGRYHPRNVY |
| 282. | 01G01 | VPWGDYHPRRVY |
| 283. | 01G04 | VPWGDYHPRMVY |
| 284. | 01G06 | VPWGDYHPRNVL |
| 285. | 01G08 | VPWGDYHPGNVY |
| 286. | 01G09 | VPWGRYHPRNVY |
| 287. | 01G10 | VPWGAYHPRNVY |
| 288. | 01G11 | VPWGDYHPRNVA |
| 289. | 01H01 | VPWGDYHPQNVY |
| 290. | 01H04 | VPWGDYHPRNVT |
| 291. | 01H05 | VPWGRYHPRNVY |
| 292. | 01H06 | VPWGDYHPGNVY |
| 293. | 01H08 | VPWGDYHPGNVY |
| 294. | 01H09 | VPWGDYHPGNVY |
| 295. | 01H10 | VPWGDYHPRNVY |
| 296. | 01H11 | VPWGDYHPGNVY |
| 297. | 02A04 | VPWGDYHPSNVY |
| 298. | 02A05 | VPWGDYHPGNVY |
| 299. | 02A07 | VPWGDYHPREVY |
| 300. | 02A08 | VPWGRYHPGNVY |
| 301. | 02A11 | VPWGDYHPRVVY |
| 302. | 02B01 | VPWGDYHPRNVM |
| 303. | 02B04 | VPWGDYHPLNVY |
| 304. | 02B05 | VPWGDYHPGNVY |
| 305. | 02B06 | VPWGDYHPGNVY |
| 306. | 02B07 | VPWGDYHPRNVT |
| 307. | 02B11 | VPWGDYHPRNVS |
| 308. | 02B12 | VPWGDYHPRNVY |
| 309. | 02C01 | VPWGDYHPGNVY |
| 310. | 02C03 | VPWGDYHPGNVY |
| 311. | 02C05 | VPWGDYHPRNVT |
| 312. | 02C06 | VPWGDYHPGNVY |
| 313. | 02D06 | VPWGRYHPRNVY |
| 314. | 02D09 | VPWGDYHPNNVY |
| 315. | 02D11 | VPWGDYHPGNVY |
| 316. | 02E03 | VPWGDYHPRNVT |
| 317. | 02E05 | VPWGDYHPGNVY |
| 318. | 02E06 | VPWGDYHPGNVY |
| 319. | 02E09 | VPWGDYHPRNVA |

| 320.      | 02F02               | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
|-----------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 321.      | 02F03               | VPWGDYHPKNVY                                                                                                                       |
| 322.      | 02F04               | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
| 323.      | 02F05               | VPWGKYHPRNVY                                                                                                                       |
| 324.      | 02F06               | VPWGRYHPRNVY                                                                                                                       |
| 325.      | 02F07               | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
| 326.      | 02F11               | VPWGDYHPRNVQ                                                                                                                       |
| 327.      | 02F12               | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
| 328.      | 02G01               | VPWGDYHPRNVS                                                                                                                       |
| 329.      | 02G02               | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
| 330.      | 02G05               | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
| 331.      | 02G06               | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
| 332.      | 02G07               | VPWGDYHPRDVY                                                                                                                       |
| 333.      | 02G08               | VPWGDYHPRNVT                                                                                                                       |
| 334.      | 02G09               | VPWGDYHPRNVA                                                                                                                       |
| 335.      | 02G11               | VPWGDYHPRNVT                                                                                                                       |
| 336.      | 02H01               | VPWGDYHPRNVY                                                                                                                       |
| 337.      | 02H04               | VPWGDYHPRNVY                                                                                                                       |
| 338.      | 02H05               | VPWGDYHPRNVV                                                                                                                       |
| 339.      | 02H06               | VPWGDYHPRNVV                                                                                                                       |
| 340.      | 02H09               | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
| 341.      | 02H11               | VPWGDYHPRNVY                                                                                                                       |
| 342.      | 01F07-M34Y          | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
| 343.      | 01F01-M34G          | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
| 344.      | 02G02-M34Y          | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
| 345.      | 02G02-M34G          | VPWGDYHPGNVY                                                                                                                       |
| SEQ ID NO | Название конструкта | Последовательности VHH                                                                                                             |
| 346.      | BH2T                | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIY LQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVYWGQGTQVTVSS  |
| 347.      | 01A01               | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTDIFSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGGSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIY LQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVAVWGQGTQVTVSS |
| 348.      | 02E09               | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNDFSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGGSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIY LQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVAVWGQGTQVTVSS |
| 349.      | 01B03               | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSKSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGKSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIY LQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVVWGQGTQVTVSS   |
| 350.      | 01B04               | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNDFSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGKSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIY LQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVKVGQGTQVTVSS  |
| 351.      | 02H05               | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNQFSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGKSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIY LQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVVWGQGTQVTVSS  |

|      |       |                                                                                                                                  |
|------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 352. | 01A02 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSSSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AINGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVHWGQGTQVTVSS  |
| 353. | 01A05 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSSSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVYWGQGTQVTVSS  |
| 354. | 01B12 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSTSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFQTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVVWGQGTQVTVSS  |
| 355. | 01G06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSRSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFETLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVLWGQGTQVTVSS  |
| 356. | 02C05 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSESPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVTWGQGTQVTVSS  |
| 357. | 02G09 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSDSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVAWGQGTQVTVSS  |
| 358. | 01C08 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSNSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGGSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVHWGQGTQVTVSS  |
| 359. | 02B01 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSNSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGRSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVMWGQGTQVTVSS  |
| 360. | 02E03 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSNSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGPTSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVTWGQGTQVTVSS |
| 361. | 01D03 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSNSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVRWGQGTQVTVSS  |
| 362. | 01D06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSRSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVTWGQGTQVTVSS  |
| 363. | 01H04 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSKSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGQSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVTWGQGTQVTVSS  |
| 364. | 02B07 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSSSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGHSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVTWGQGTQVTVSS  |
| 365. | 01A08 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSSSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGESTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRKVYWGQGTQVTVSS  |
| 366. | 01B07 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSRSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGNSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGIYHPRNVYWGQGTQVTVSS  |
| 367. | 01F03 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSESPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGNSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGTYHPRNVYWGQGTQVTVSS  |
| 368. | 02F05 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSVSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGNSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGKYHPRNVYWGQGTQVTVSS  |
| 369. | 02H04 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSVSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGNSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVYWGQGTQVTVSS  |
| 370. | 02A07 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNIFSKSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGNSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPREVYWGQGTQVTVSS  |

|      |       |                                                                                                                                  |
|------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 371. | 01D05 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSDSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGTSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPRNVYWGGGTQVTVSS  |
| 372. | 01E05 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSRSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGTSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGKYHPRNVYWGGGTQVTVSS   |
| 373. | 01F02 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSHSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGTSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS   |
| 374. | 02C06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSTSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGTSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS  |
| 375. | 02F11 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSTSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGTSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPRNVQWGGGTQVTVSS  |
| 376. | 01E06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSLSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPRNVYWGGGTQVTVSS  |
| 377. | 01A03 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSI SPGGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 378. | 02A11 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNHFISIPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPRVYWGGGTQVTVSS   |
| 379. | 01D07 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFASPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPRNVNWGGGTQVTVSS   |
| 380. | 01D10 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFASPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS    |
| 381. | 01A07 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNISISIPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGTSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS  |
| 382. | 02F12 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIESISIPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGTSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 383. | 02B05 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSI SPYGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGTSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 384. | 01E04 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIASISIPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGTSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 385. | 02A05 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIASISIPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGKSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 386. | 02C03 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIASISIPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 387. | 01E03 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNITSISIPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 388. | 01H09 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIMSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGNSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 389. | 02G05 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNITSISIPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGNSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 390. | 01C01 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIVSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGHSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |

|      |       |                                                                                                                                  |
|------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 391. | 01D02 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIVSISPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGKSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS  |
| 392. | 02D09 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIVSISPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGKSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPNNVYWGGGTQVTVSS  |
| 393. | 02C01 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIIISISPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGASTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 394. | 02G02 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIITPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGASTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 395. | 01B05 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNITSIISPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFETLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 396. | 01G08 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIQSISPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFETLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS  |
| 397. | 01H06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTSDFSISPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFETLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 398. | 01F04 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIDSIISPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFQTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 399. | 01H08 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIMSIISPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTVYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 400. | 02F07 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIESISPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS  |
| 401. | 01C05 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSSSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFKTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTARYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS  |
| 402. | 02F04 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSSSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS  |
| 403. | 02B06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSNSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS  |
| 404. | 01F07 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSTSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTIYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS  |
| 405. | 02B04 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSTSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTIYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPLNVYWGGGTQVTVSS  |
| 406. | 01H11 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCVASTNIFSTSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 407. | 02E06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSDSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTFYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVYWGGGTQVTVSS  |
| 408. | 01E08 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSQSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPGNVCWGGGTQVTVSS  |
| 409. | 02A04 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSQSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGKSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG DYHPSNVYWGKGTQVTVSS  |
| 410. | 02A08 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSRSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGESTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WG RYHPGNVYWGGGTQVTVSS  |



|      |       |                                                                                                                                  |
|------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 411. | 02E05 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSRSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGISTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPGNVYWGGGTQVTVSS   |
| 412. | 02H09 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSRSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPGNVYWGGGTQVTVSS   |
| 413. | 02G06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSGSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGNSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPGNVYWGGGTQVTVSS   |
| 414. | 01B09 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASSNIFSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 415. | 02F03 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSI YPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPKNVYWGGGTQVTVSS  |
| 416. | 02F02 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSKSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPGNVYWGGGTQVTVSS   |
| 417. | 02H01 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSKSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVYWGGGTQVTVSS   |
| 418. | 01G10 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNEFSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGLSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGAYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 419. | 02D11 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASTNEFSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGESTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPGNVYWGGGTQVTVSS |
| 420. | 01B01 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIPSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGESTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVAWGGGTQVTVSS  |
| 421. | 01G11 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIPSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGASTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVAWGGGTQVTVSS  |
| 422. | 01H10 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIPSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGESTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVYWGGGTQVTVSS  |
| 423. | 01C04 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIPSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVYWGGGTQVTVSS  |
| 424. | 01D04 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNITSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGVSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVQWGGGTQVTVSS  |
| 425. | 01E07 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIPSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGQSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVQWGGGTQVTVSS  |
| 426. | 02B11 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIVSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVSWGGGTQVTVSS  |
| 427. | 01F10 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASSNIFSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGESTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVTWGGGTQVTVSS |
| 428. | 02G08 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIDSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGESTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVTWGGGTQVTVSS  |
| 429. | 02G11 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIDSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVTWGGGTQVTVSS  |

|      |       |                                                                                                                                 |
|------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 430. | 02H06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIRSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVVWGQGTQVTVSS |
| 431. | 01B02 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNITSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AISGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNEVP<br>WGDYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 432. | 02H11 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNITSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGESTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 433. | 01F08 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNITSVSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHG PSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPTNVYWGGGTQVTVSS |
| 434. | 01H01 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIGSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGQSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPQNVYWGGGTQVTVSS |
| 435. | 01E10 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIESI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGKSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRRVYWGGGTQVTVSS |
| 436. | 01G01 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIVSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRRVYWGGGTQVTVSS |
| 437. | 01G04 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIDSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGNSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRMVYWGGGTQVTVSS |
| 438. | 01A04 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFMI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 439. | 01F12 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFRI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 440. | 01B06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIS PMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGEYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 441. | 01C06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIS PMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGKYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 442. | 01B08 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIESI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGSSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 443. | 01C02 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIESI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGNSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 444. | 01C10 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNISSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGYYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 445. | 01F09 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNISSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGHSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 446. | 02D06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNISSI SPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTVYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS |
| 447. | 01A06 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIRPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTVYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVYWGGGTQVTVSS  |
| 448. | 01C07 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGSYHPRNVYWGGGTQVTVSS   |
| 449. | 01G09 | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFNIS PMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTYYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS |

|      |                  |                                                                                                                                                                                                     |
|------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 450. | 01F05            | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSSSPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTWYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS                                                                      |
| 451. | 02B12            | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIISSIPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFDTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVYWGGGTQVTVSS                                                                      |
| 452. | 02G01            | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIINPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFDTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRNVSWGGGTQVTVSS                                                                     |
| 453. | 01A09            | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIITPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGRSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGSYHPRNVYWGGGTQVTVSS                                                                     |
| 454. | 01H05            | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIITPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGTSTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS                                                                     |
| 455. | 02F06            | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIITPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGESTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGRYHPRNVYWGGGTQVTVSS                                                                     |
| 456. | 02G07            | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIITPMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGESTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPRDVYWGGGTQVTVSS                                                                     |
| 457. | 01F07-M34Y       | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSTSPYGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTIYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPGNVYWGGGTQVTVSS                                                                      |
| 458. | 01F01-M34G       | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSTSPGGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTIYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPGNVYWGGGTQVTVSS                                                                      |
| 459. | 02G02-M34Y       | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIITPYGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGASTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPGNVYWGGGTQVTVSS                                                                     |
| 460. | 02G02-M34G       | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASNIFSIITPGGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGASTLYADSVKGRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNKVP<br>WGDYHPGNVYWGGGTQVTVSS                                                                     |
| 461. | F1               | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAAS                                                                                                                                                                           |
| 462. | F1               | EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCVAS                                                                                                                                                                           |
| 463. | F2               | WYRQAPGKQRELVA                                                                                                                                                                                      |
| 464. | F3               | GRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNK                                                                                                                                                                   |
| 465. | F3               | GRFTISRDNAKNSIYLQMNSLRPEDTALYYCNE                                                                                                                                                                   |
| 466. | F4               | WGQGTQVTVSS                                                                                                                                                                                         |
| 467. | F4               | WGKGTQVTVSS                                                                                                                                                                                         |
| 468. | BCMA<br>человека | MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSV<br>KGTNAILWTCGLGLSLIIISLAVFVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLG<br>MANIDLEKSRTGDEIILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDSHCFPLP<br>AMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSATEIEKSISAR |
| 469. | BCMA мыши        | MAQQCFHSEYFDSLHACKPCHLRCSNPPATCQPYCDPSVTSSVKGYT<br>VLWIFLGLTLVLSLALFTISFLLRKMNPALKDEPQSPGQLDGSQAQLDK<br>ADTELTRIRAGDDRIFPRSLEYTVEECTCEDCVKSKPKGSDHFFPLPA<br>MEEGATILVTTKTGDYGKSSVPTALQSVGMKEKPTHTR  |

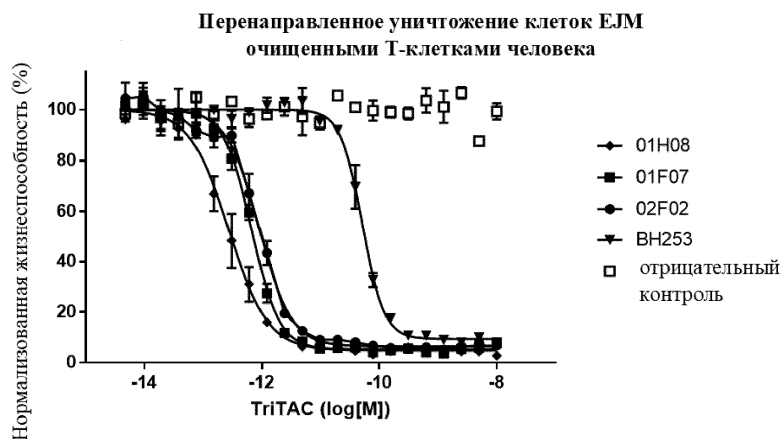
|      |                                         |                                                                                                                                                                                                    |
|------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 470. | BCMA<br>яванского<br>макака             | MLQMARQCSQNEYFDSLHDCPCQLRCSSTPPLTCQRYCNASMTNSVK<br>GMNAILWTCLGLSLIIISLAVFVLTFLLRKMSSEPLKDEFKNTGSGLLGM<br>ANIDLEKGRGTGDEIVLPRGLEYSVEECTCEDCIKNKPKVSDSDHCFPLPA<br>MEEGATILVTTKTNDYCNLSAALSVEIEKSISAR |
| 471. | 6xHis-<br>метка                         | His-His-His-His-His-His                                                                                                                                                                            |
| 472. | 253BH10<br>(антитело<br>ламы к<br>BCMA) | QVQLVESGGGLVQPGESLRSLCAASTNIFSIPTMGWYRQAPGKQRELVA<br>AIHGFSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCNKVP<br>WGDYHPRNVYWGQGTQVTVSS                                                                    |
| 473. | 253BH10<br>CDR1                         | TNIFSIPTMG                                                                                                                                                                                         |
| 474. | 253BH10<br>CDR2                         | AIHGFSTLYADSVK                                                                                                                                                                                     |
| 475. | 253BH10<br>CDR3                         | VPWGDYHPRNVY                                                                                                                                                                                       |

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Однодоменный белок, связывающий агент созревания В-клеток (BCMA), содержащий определяющие комплементарность области CDR1, CDR2 и CDR3, причем:

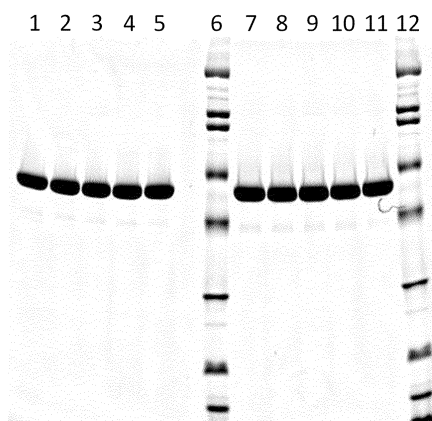
- (a) аминокислотная последовательность CDR1 является такой, как представлено в SEQ ID NO: 76;
- (b) аминокислотная последовательность CDR2 является такой, как представлено в SEQ ID NO: 190; и
- (c) аминокислотная последовательность CDR3 является такой, как представлено в SEQ ID NO: 304.

2. Однодоменный связывающий BCMA белок по п.1, причем белок содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 383.



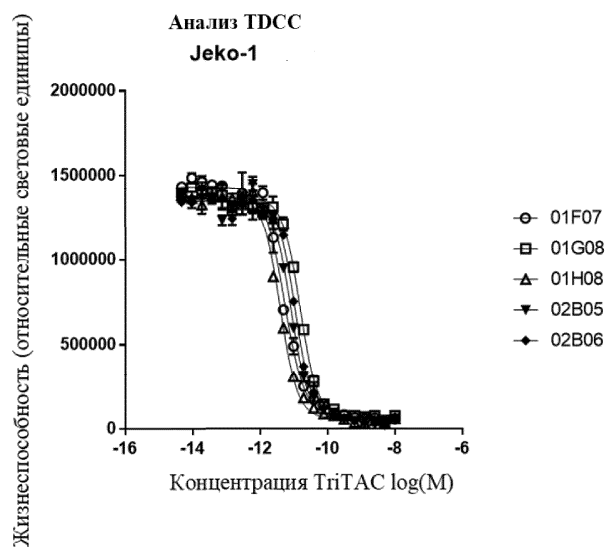
Фиг. 1

SDS-PAGE ОЧИЩЕННЫХ ТРИСПЕЦИФИЧЕСКИХ НАЕЦЛЕННЫХ НА ВСМА  
БЕЛКОВ

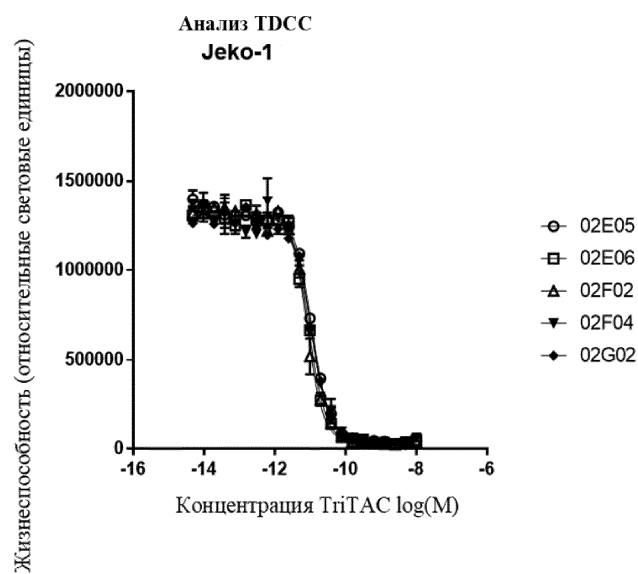


Дорожка 1: 01F07-M34Y TriTAC, невосстановленный  
 Дорожка 2: 01F07-M34G-TriTAC, невосстановленный  
 Дорожка 3: 02B05 TriTAC, невосстановленный  
 Дорожка 4: 02G02-M34Y TriTAC, невосстановленный  
 Дорожка 5: 02G02 M34G TriTAC, невосстановленный  
 Дорожка 6: стандарт SDS-PAGE широкого диапазона (Bio-Rad, № по кат. 1610317)  
 Дорожка 7: 01F07-M34Y TriTAC, невосстановленный  
 Дорожка 8: 01F07-M34G-TriTAC, невосстановленный  
 Дорожка 9: 02B05 TriTAC, невосстановленный  
 Дорожка 10: 02G02-M34Y TriTAC, невосстановленный  
 Дорожка 11: 02G02 M34G TriTAC, невосстановленный  
 Дорожка 12: стандарт SDS-PAGE широкого диапазона (Bio-Rad, № по кат. 1610317)

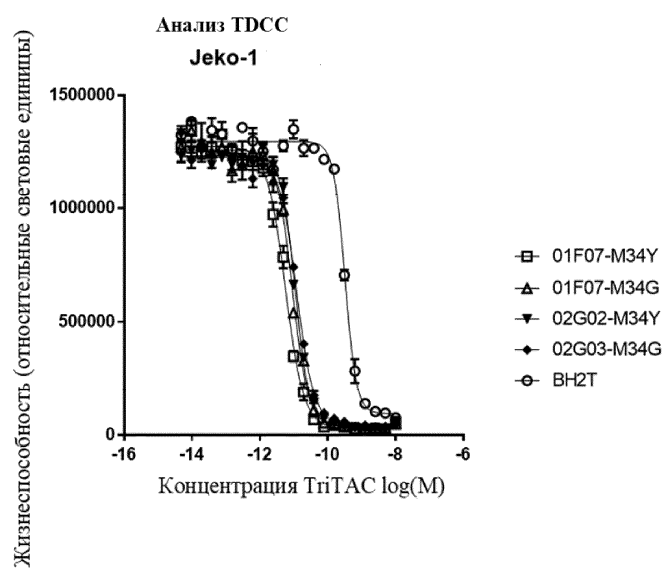
Фиг. 2



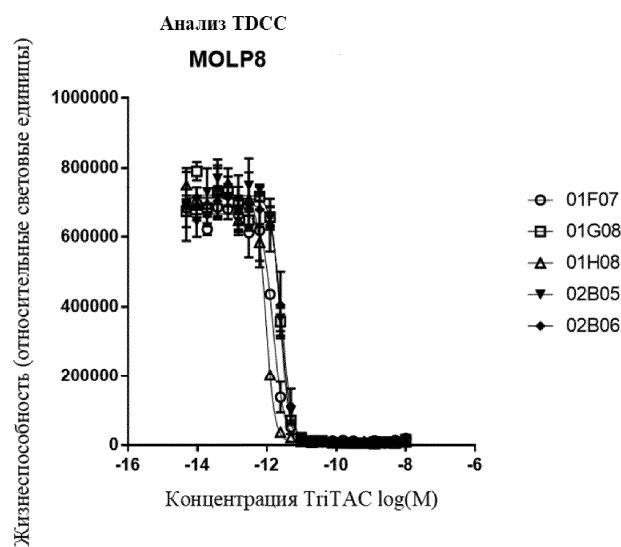
Фиг. 3А



Фиг. 3В



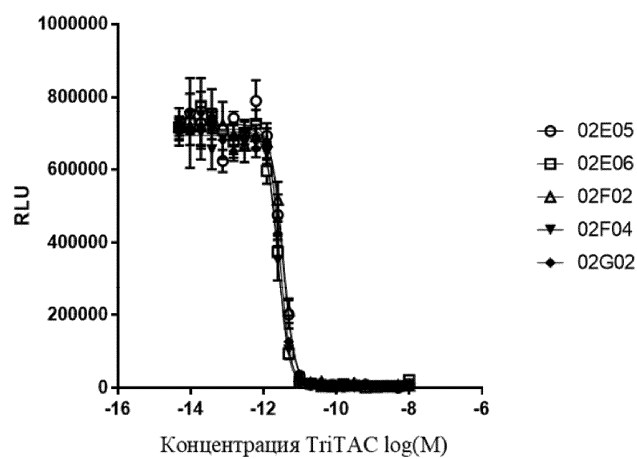
Фиг. 3С



Фиг. 3D

## Анализ TDCC

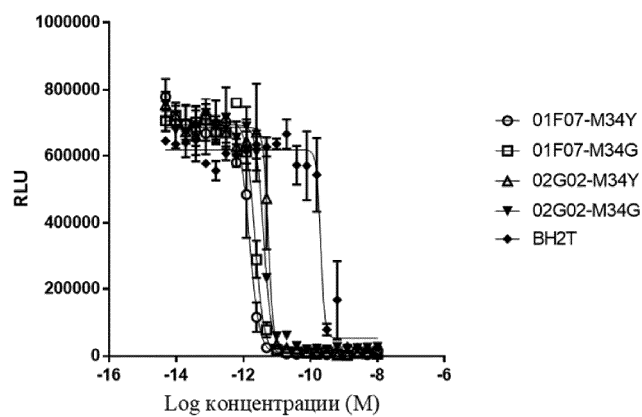
## MOLP8



Фиг. 3E

## Анализ TDCC

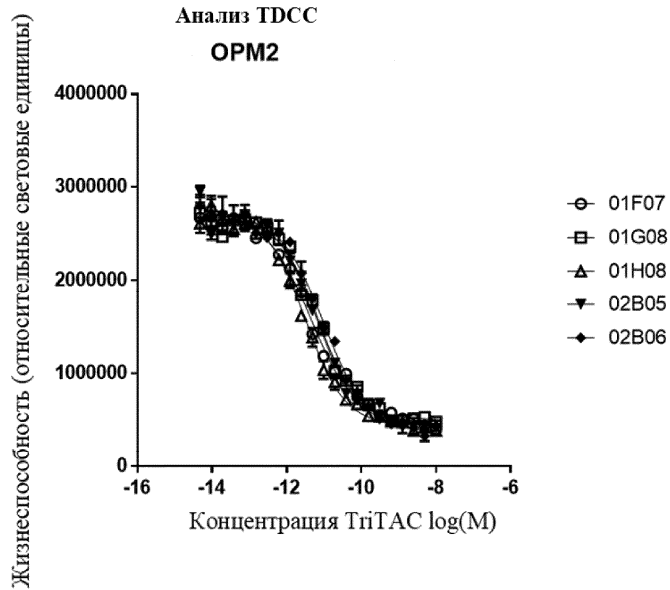
## MOLP8



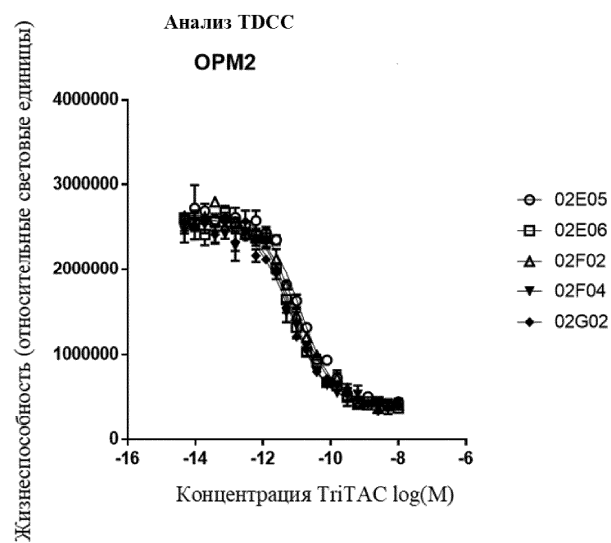
Фиг. 3F

## Анализ TDCC

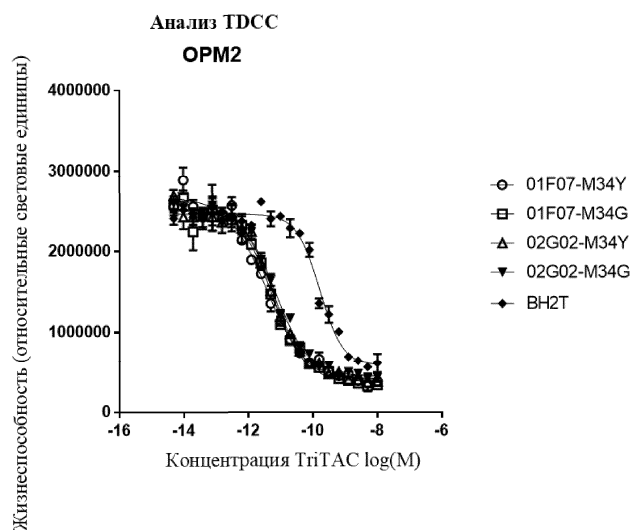
## OPM2



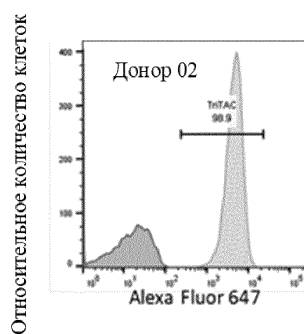
Фиг. 3G



Фиг. 3Н



Фиг. 3I

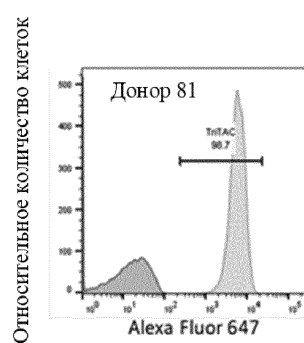


Фиг. 4А

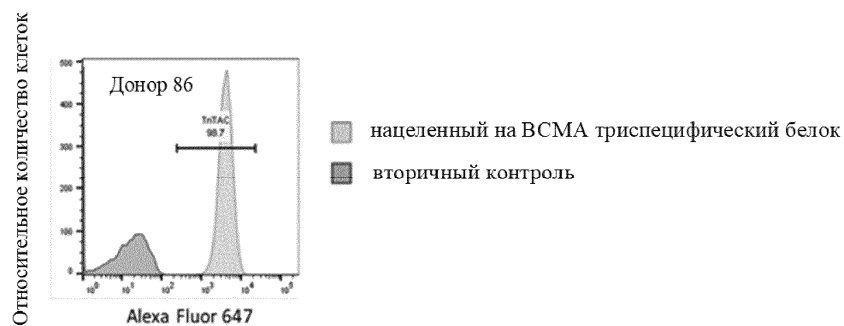




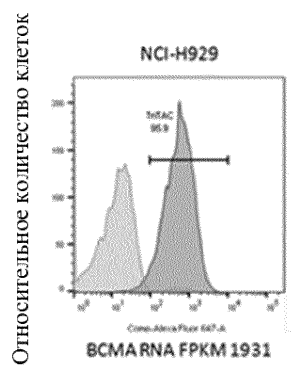
Фиг. 4В



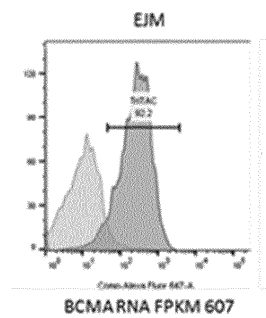
Фиг. 4С



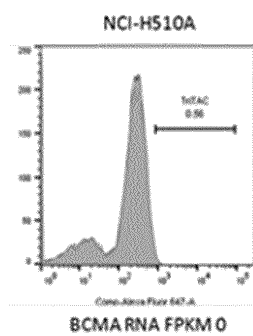
Фиг. 4D



Фиг. 5А

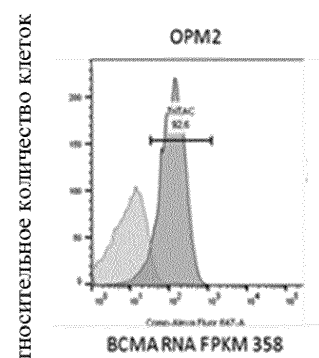


Фиг. 5B

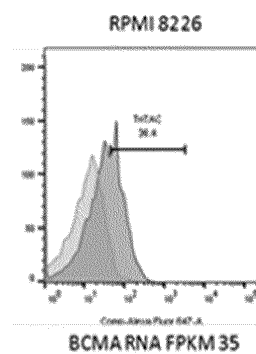


■ нацеленный на ВСМА триспецифический белок  
 ■ нацеленный на GFP триспецифический белок

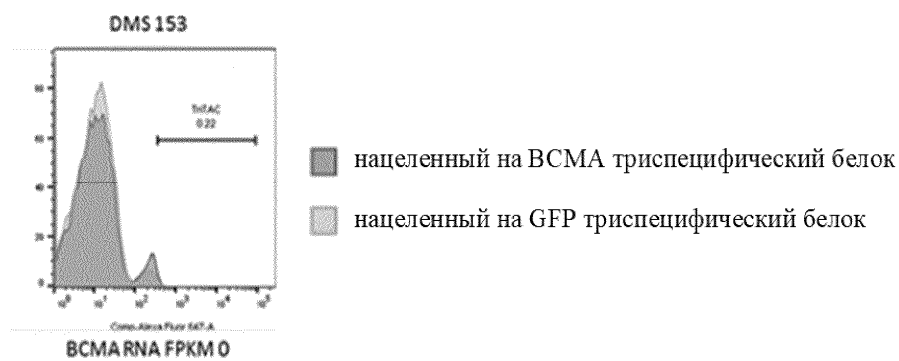
Фиг. 5C



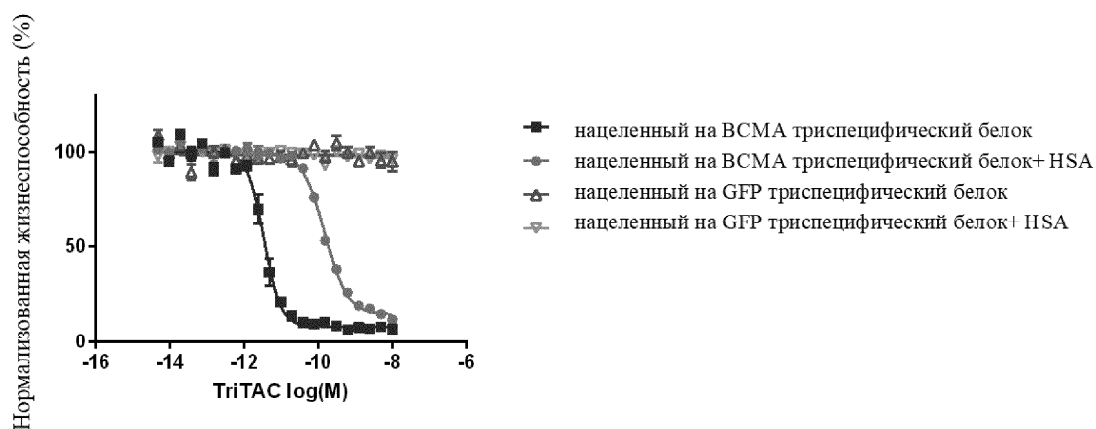
Фиг. 5D



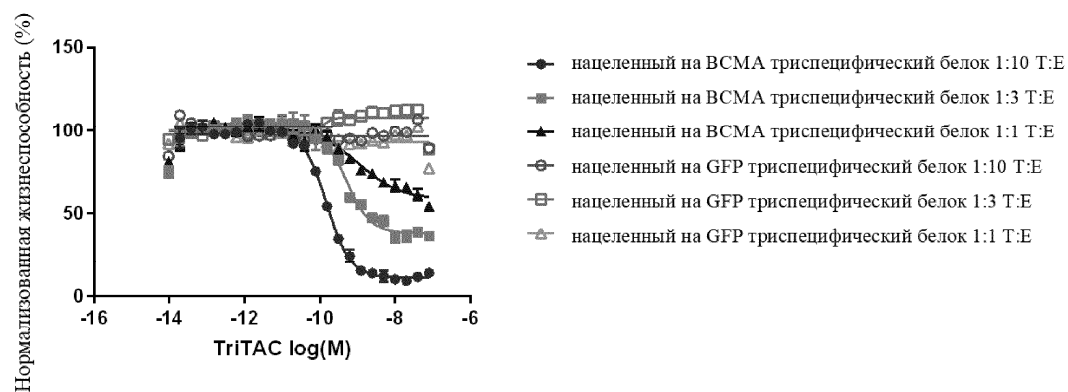
Фиг. 5E



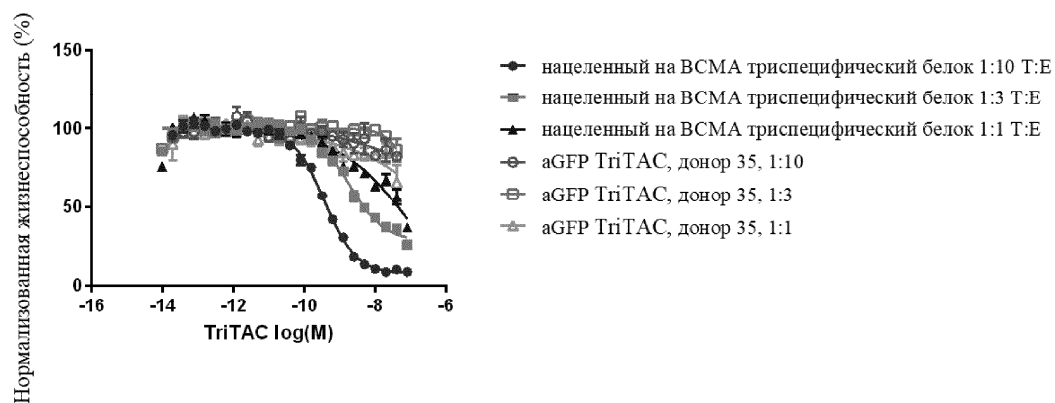
Фиг. 5F



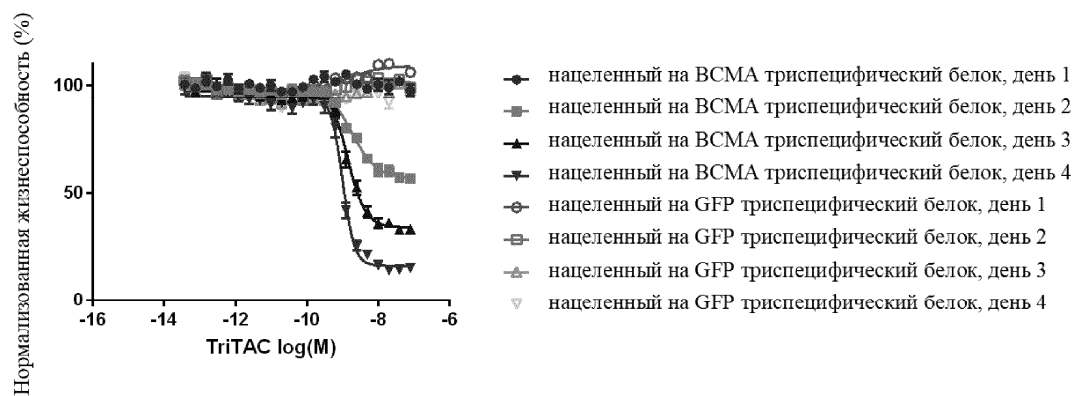
Фиг. 6



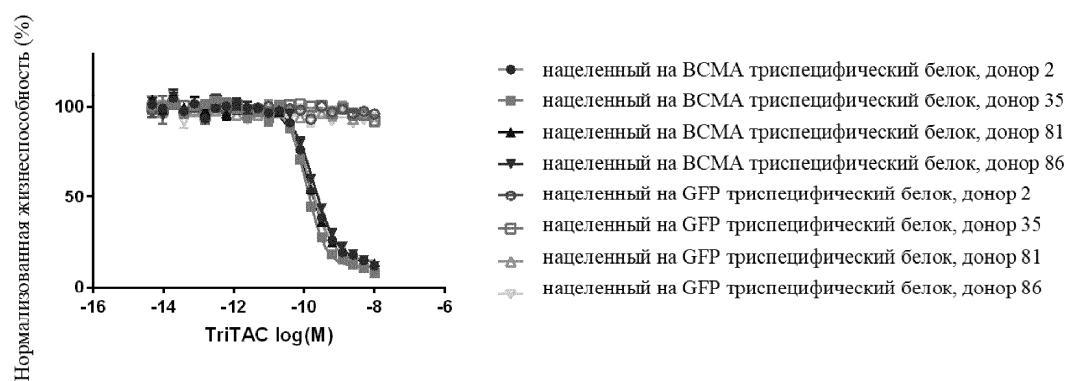
Фиг. 7



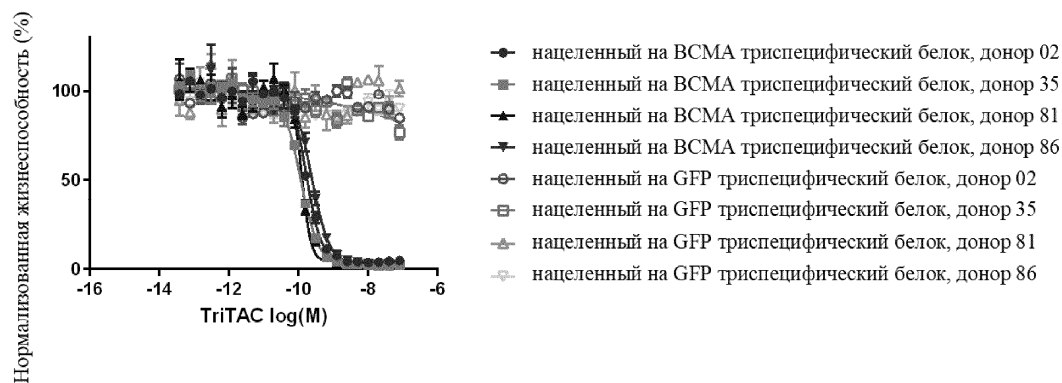
Фиг. 8



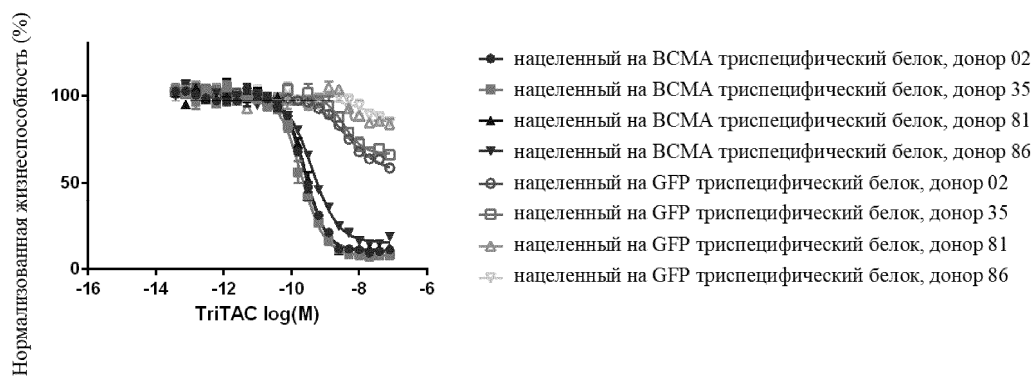
ФИГ. 9



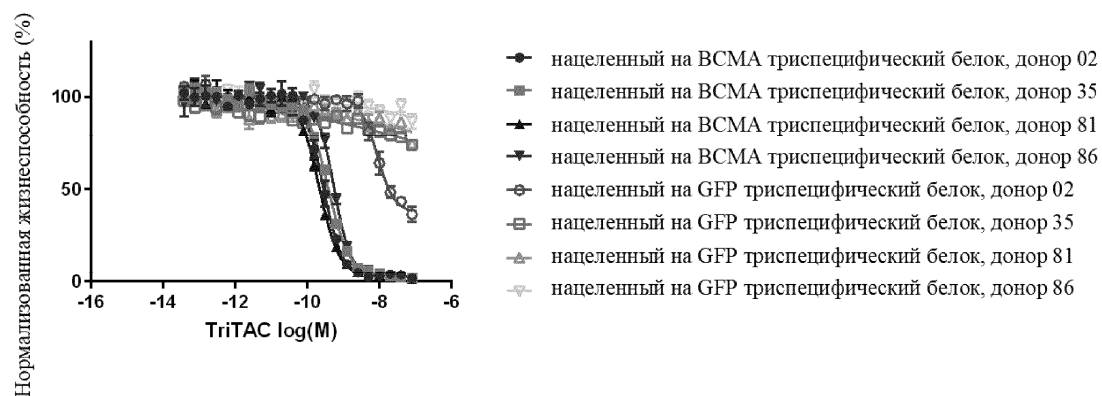
ФИГ. 10



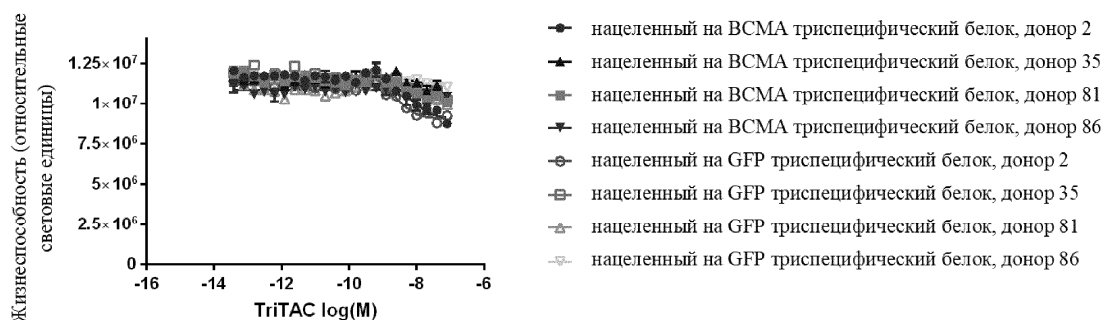
ФИГ. 11



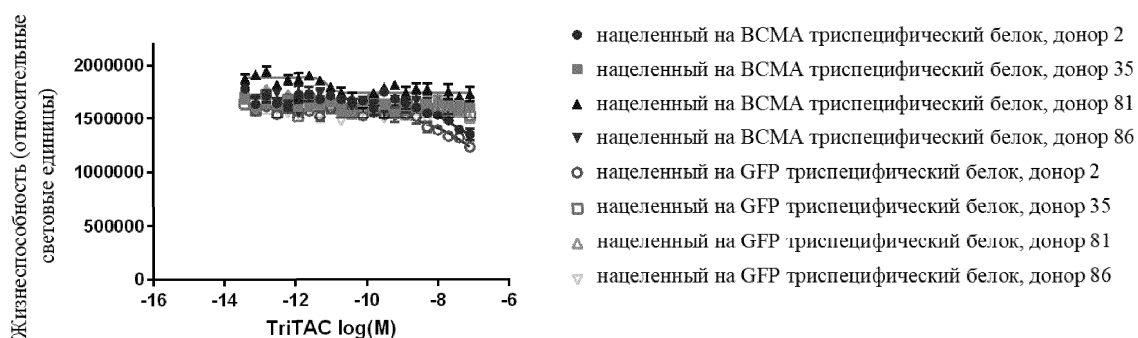
ФИГ. 12



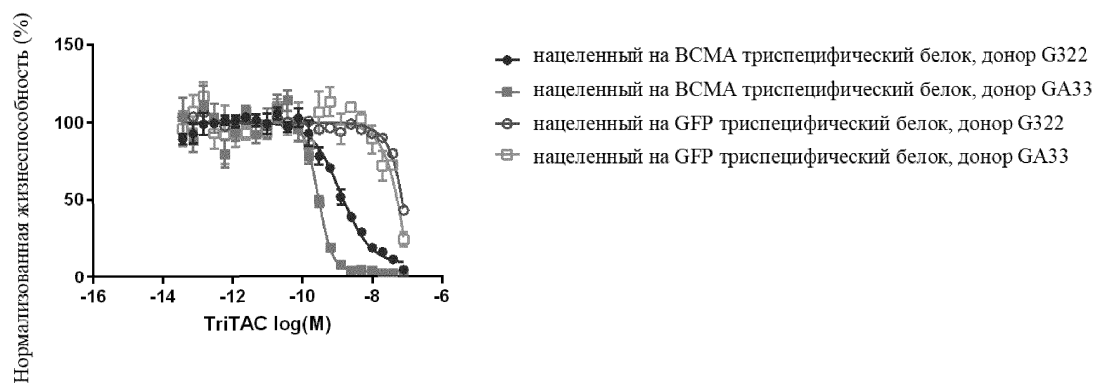
Фиг. 13



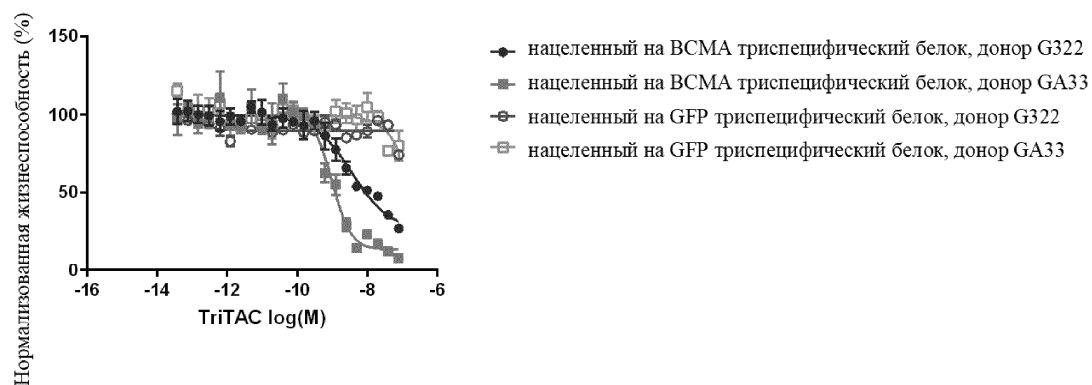
Фиг. 14



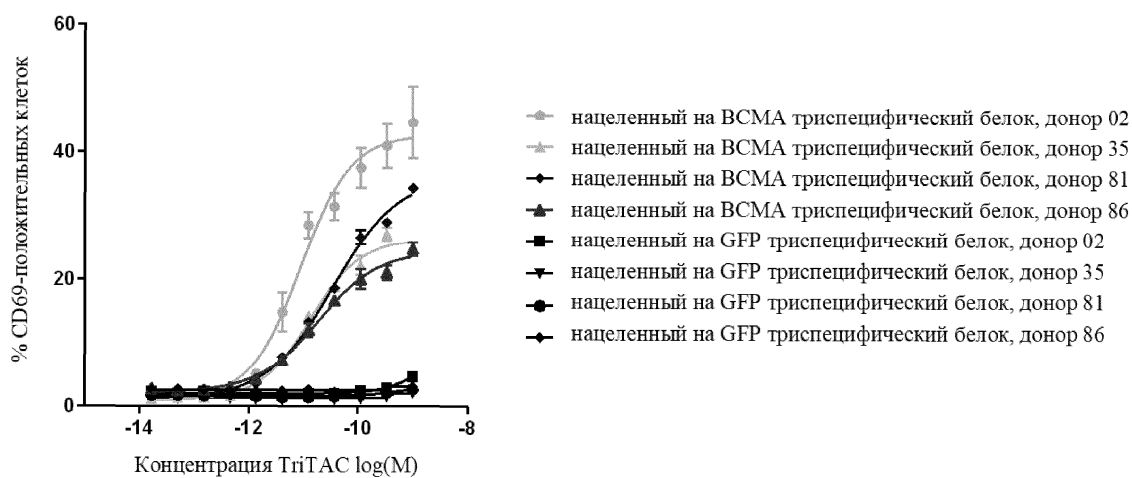
Фиг. 15



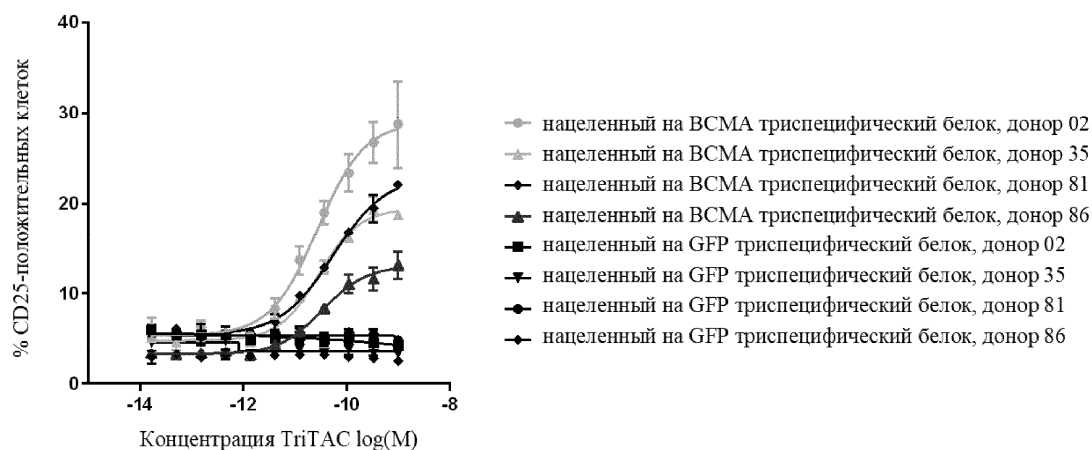
Фиг. 16



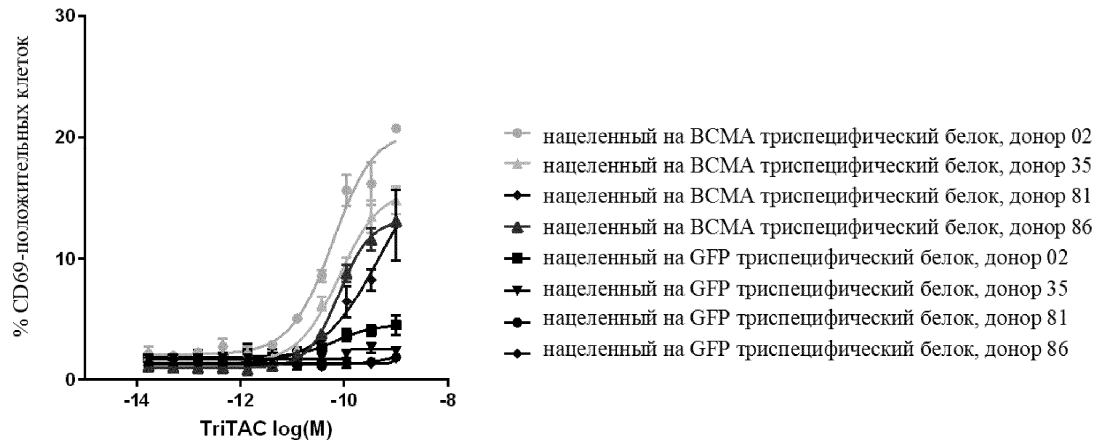
Фиг. 17



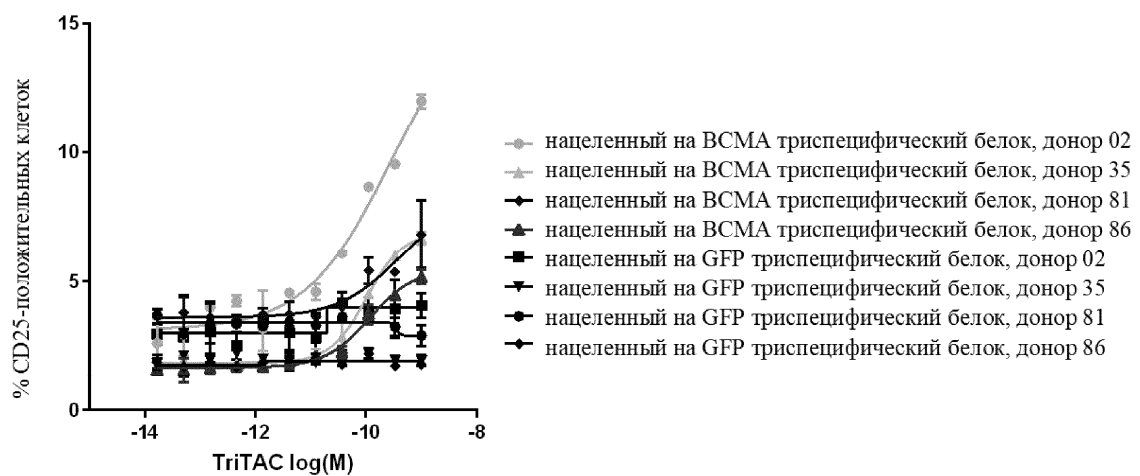
Фиг. 18



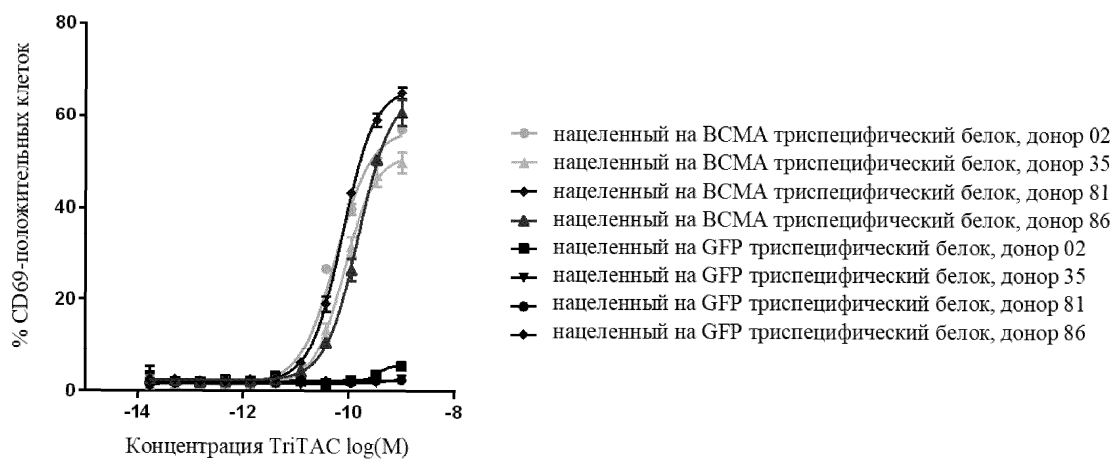
Фиг. 19



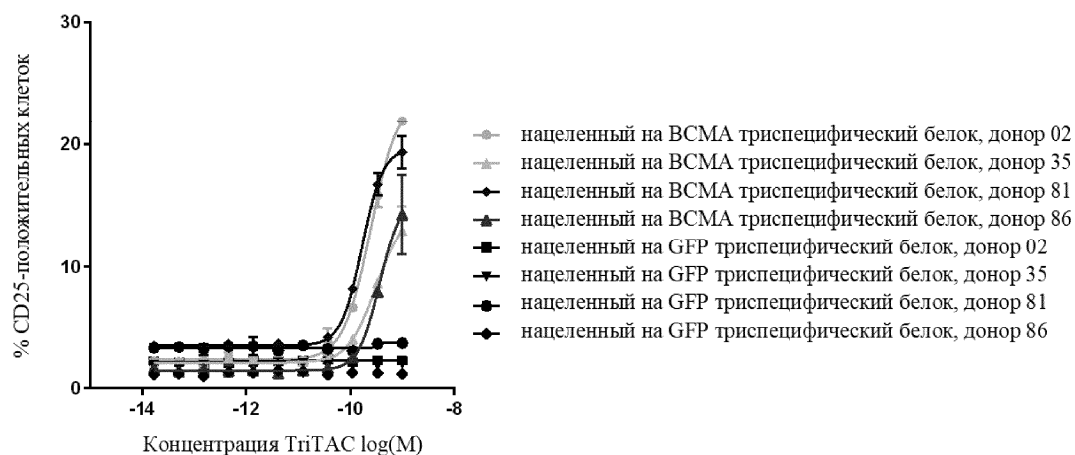
ФИГ. 20



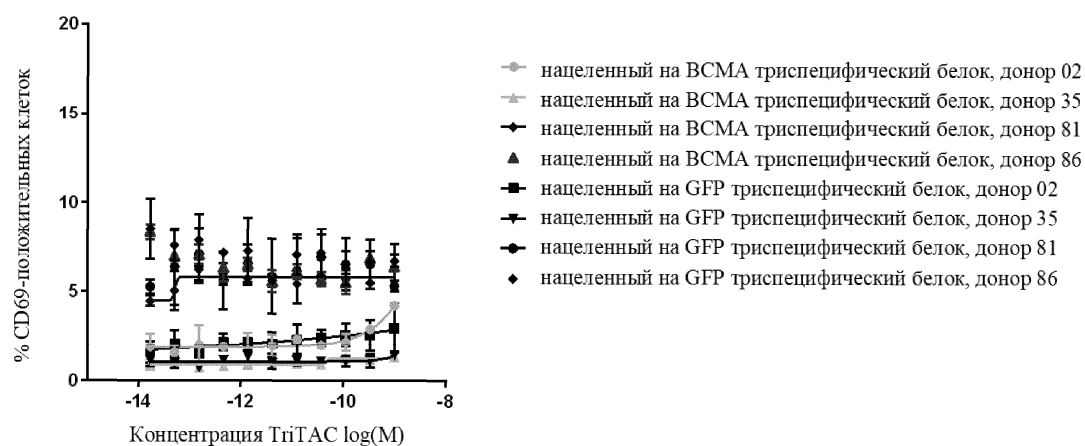
ФИГ. 21



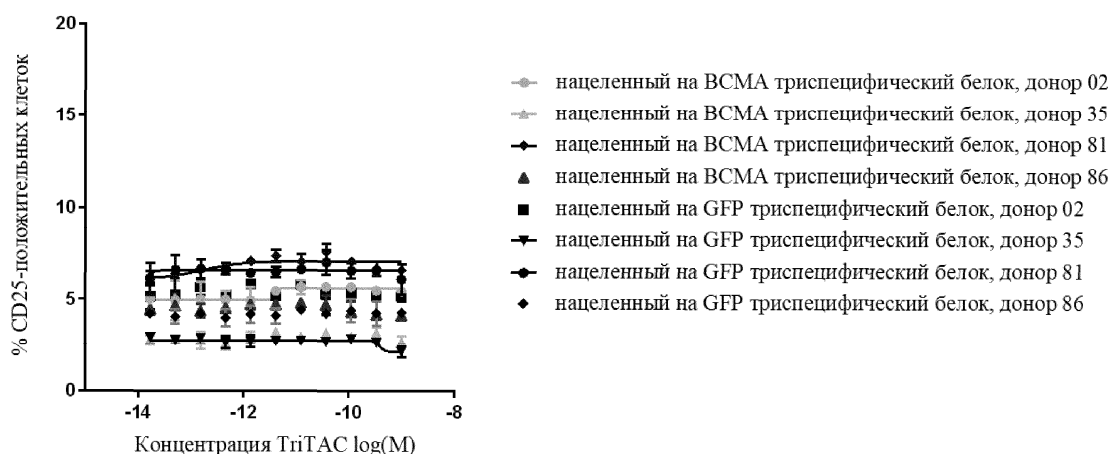
ФИГ. 22



Фиг. 23

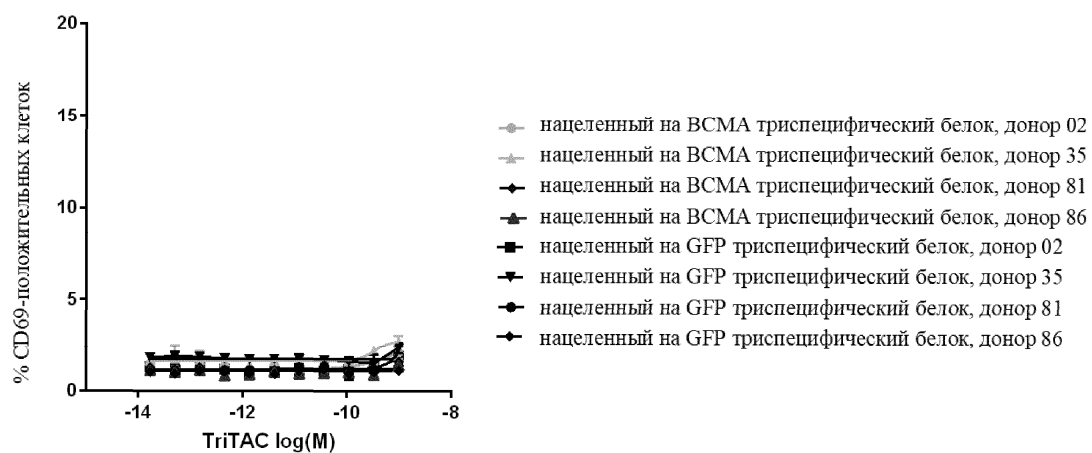


Фиг. 24

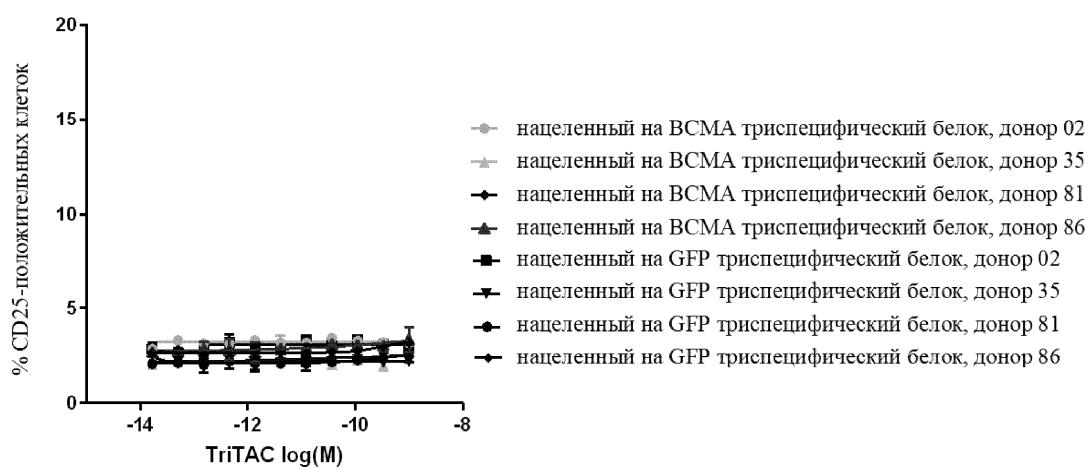


Фиг. 25

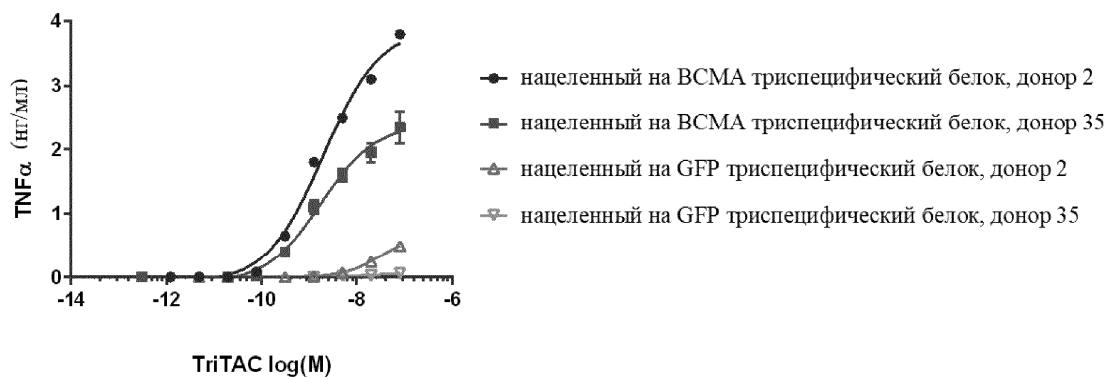




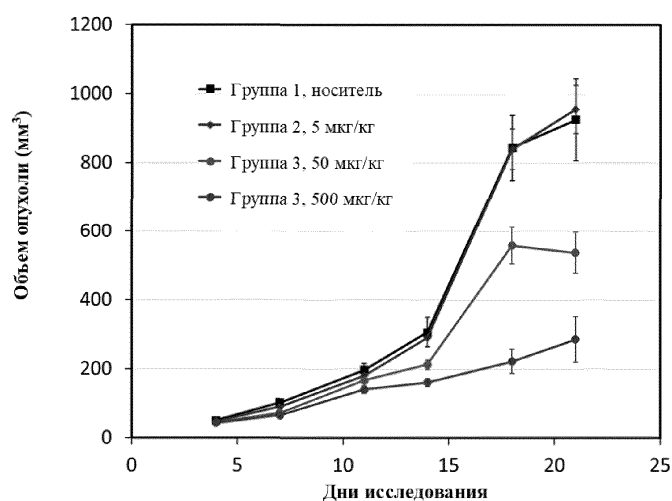
Фиг. 26



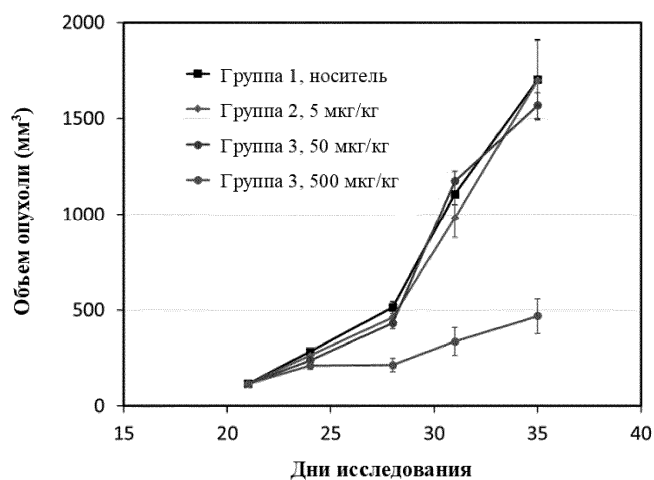
Фиг. 27



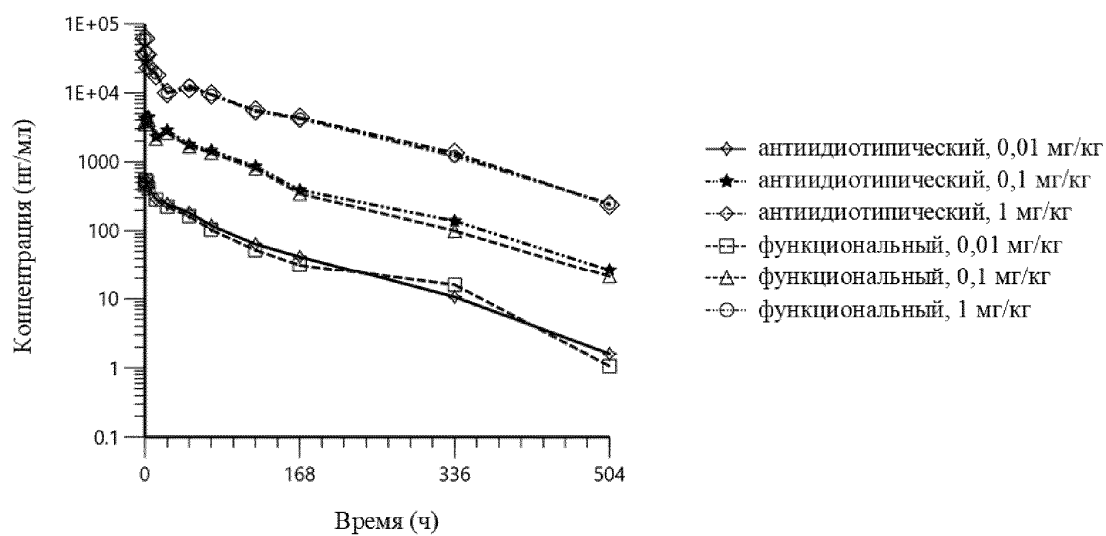
Фиг. 28

Средний объем опухоли  $\pm$  SEM

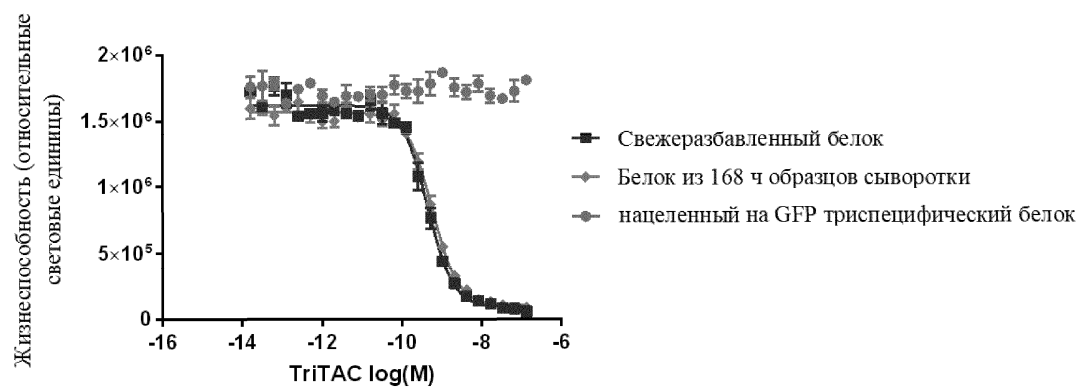
Фиг. 29

Средний объем опухоли  $\pm$  SEM

Фиг. 30



Фиг. 31



| образец                 | EC50 (M) |
|-------------------------|----------|
| Свежеразбавленный белок | 4.4E-10  |
| Белок из 168 ч образцов | 5.8E-10  |

Фиг. 32



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2